

## Cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile : bilan et perspectives

par Florent ENGELMANN

ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour  
le Développement en Coopération) BP : 5045, F-34032 Montpellier Cédex 1

**Résumé** - La technique de cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile, mise au point par l'ORSTOM et l'IRHO, a maintenant été appliquée à 27 clones. Le taux de reprise moyen est de 12,5% des embryoides congelés. Des embryoides de 2 clones ont été stockés respectivement 12 et 15 mois dans l'azote liquide, sans que l'on observe de modification du taux de reprise. Des cultures provenant de 10 clones cryoconservés ont été envoyées à la Station de Recherches IRHO/CIRAD de la Mé en Côte d'Ivoire, pour produire des vitro-plants afin de réaliser des essais en champ. Des plants de 2 clones ont été plantés en champ en décembre 1987. Leur développement végétatif s'est avéré comparable à celui des témoins provenant de matériel non congelé et les premières inflorescences mâles observées en avril 1989, sont normales. Des plantules de 8 nouveaux clones cryoconservés sont actuellement en préépinière. Elles seront plantées en champ afin de confirmer ces observations préliminaires.

Ces premiers résultats ont conduit l'IRHO à installer des unités de cryoconservation dans les laboratoires produisant des vitro-plants de palmier selon le procédé ORSTOM/IRHO. Les premières congélations ont commencé en 1989, simultanément en France, Côte d'Ivoire, Malaisie et Indonésie. La première série d'expérimentations porte sur environ 150 clones.

Les résultats seront disponibles en juin 1990. Il nous renseigneront sur la possibilité d'utiliser en routine la cryoconservation pour le stockage à long terme des clones d'embryoïdes de palmier à huile.

**Summary** - The oil palm somatic embryo cryopreservation technique which was developed by the ORSTOM/IRHO research team has been applied until now to 27 clones. The average recovery rate is 12.5% of the frozen embryoïds. Embryoïds from 2 clones were stored in liquid nitrogen for 12 and 15 months respectively, without changes in their recovery rates. Embryoïd cultures obtained from 10 cryopreserved clones have been sent to the IRHO/CIRAD La Mé Research Station in Côte d'Ivoire, for plantlet production and field trials. Palms from 2 clones were planted in the field in december 1987. Their vegetative development has been comparable to that of controls originating from non frozen material and the first male inflorescences observed in april 1989 are normal. Ramets from 8 additional clones are at the present time in the prenursery. They will be planted in the field in order to confirm these preliminary observations.

These results have led IRHO to set up cryopreservation units in the laboratories producing clonal plantlets of oil palm through the ORSTOM/IRHO process. The first freezing experiments have started in 1989 simultaneously in France (ORSTOM Research laboratory, Montpellier), in Côte d'Ivoire (IRHO, La Mé), in Malaysia (FELDA) and Indonesia (SOCFINDO, P.P. MARIHAT). The first set of experiments will be carried out on approximatively 150 clones.

The data which will be available in june 1990, will inform us about the feasibility of using cryopreservation as a routine technique for the long-term storage of oil palm clones.

**Key words** : cryopreservation - germplasm storage - oil palm - somatic embryos

\*

\* \*

## INTRODUCTION

Le procédé de multiplication *in vitro* du palmier à huile mis au point par l'équipe ORSTOM/IRHO (IRHO : Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux, 11 square Pétrarque, 75116 Paris, France) utilise l'embryogenèse somatique (Pannetier *et al.*, 1981). Les embryoïdes se multiplient, de manière parfois continue, par embryogenèse adventive, ce qui permet la production à grande échelle de vitro-plants. Le développement actuel de ce procédé est le suivant : il est maintenant utilisé dans 5 laboratoires (France, Côte d'Ivoire, Malaisie, Indonésie). Il a été appliqué à 850 palmiers et 456 clones d'embryoïdes ont été obtenus. Environ 500 000 vitro-plants ont déjà été produits et 138,5 hectares d'essais, incluant 79 clones, ont été plantés en Côte d'Ivoire. Des anomalies, qui touchent le développement des inflorescences, sont observées sur moins de 5% des palmiers produits. Les recherches pour la mise au point d'un procédé de cryoconservation ont commencé en France dès 1982 (Engelmann et Dereuddre, 1988 a ; Engelmann et Duval, 1986 ; Engelmann *et al.*, 1985), afin de faire face aux problèmes suivants :

- d'une part, les risques d'obtenir du matériel anormal, qui augmentent avec la durée de culture *in vitro* (Larkin et Scowcroft, 1981), comme cela a été montré récemment dans le cas du palmier à huile par des auteurs anglais (Corley *et al.*, 1986). Le stockage d'embryoïdes le plus tôt possible après leur obtention doit permettre d'augmenter nos chances de conserver du matériel conforme.

- d'autre part, la production continue de nouveaux clones entraîne des problèmes de gestion des laboratoires. La cryoconservation permet de stocker les clones non utilisés pour la production et de réduire ainsi le volume de matériel qui doit être entretenu régulièrement.

Cet article fait le point des résultats obtenus et présente les perspectives d'application du procédé de cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile.

## MATERIEL ET METHODE

### Matériel végétal

Les clones d'embryoïdes utilisés pour cette étude proviennent de palmiers sélectionnés mis en culture, soit en France (ORSTOM, Bondy), soit en Côte d'Ivoire (IRHO/CIRAD, La Mé).

Les cultures sont repiquées tous les mois sur un milieu de Murashige et Skoog modifié (Hanover et Pannetier, 1982) dépourvu de régulateurs de croissance et contenant 0,1 M de saccharose. Elles sont placées à 27°C sous un éclairage de 20W m<sup>2</sup> (tubes fluorescents Durotest type True Lite) avec une photopériode de 12 heures sur 24.

### Méthode de congélation

La méthode de congélation utilisée comporte les étapes suivantes qui sont schématisées dans la figure 1 :

- Obtention de jeunes embryoïdes, seuls susceptibles de résister à la congélation. Ce type d'embryoïdes, peu fréquemment observé dans les cultures sur milieu standard, est obtenu avec une fréquence élevée après une culture de 2 mois sur un milieu enrichi en saccharose (Engelmann et Dereuddre, 1988 a).

- Prétraitement : les massifs d'embryoïdes sont placés pendant 7 jours sur un milieu fortement enrichi en saccharose, ce qui a pour effet de diminuer leur teneur en eau de 80 à 60% environ par rapport à leur poids de matière fraîche.

- Congélation : les massifs d'embryoïdes, placés dans des cryotubes stériles de 2 ml, sont congelés rapidement (200°C min.<sup>-1</sup>), par immersion directe dans l'azote liquide, ou en 2 étapes comprenant un refroidissement contrôlé de + 20° à -100°C, réalisé au moyen d'un congélateur programmable (type Minicool,

commercialisé par l'Air Liquide), suivi d'une immersion dans l'azote liquide. Les vitesses de refroidissement doivent être comprises entre  $5^{\circ}\text{C min.}^{-1}$  et  $40^{\circ}\text{C min.}^{-1}$  (Engelmann et Dereuddre, 1988 b).

– Réchauffement : après stockage dans l'azote liquide, les massifs d'embryoïdes sont réchauffés en plongeant les cryotubes pendant 1 minute dans un bain-marie thermostaté à  $40^{\circ}\text{C}$ .

– Post-traitement : les massifs d'embryoïdes sont cultivés pendant 3 semaines sur des milieux additionnés d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et progressivement appauvris en saccharose. Ils sont ensuite repiqués sur le milieu standard dépourvu d'auxine.

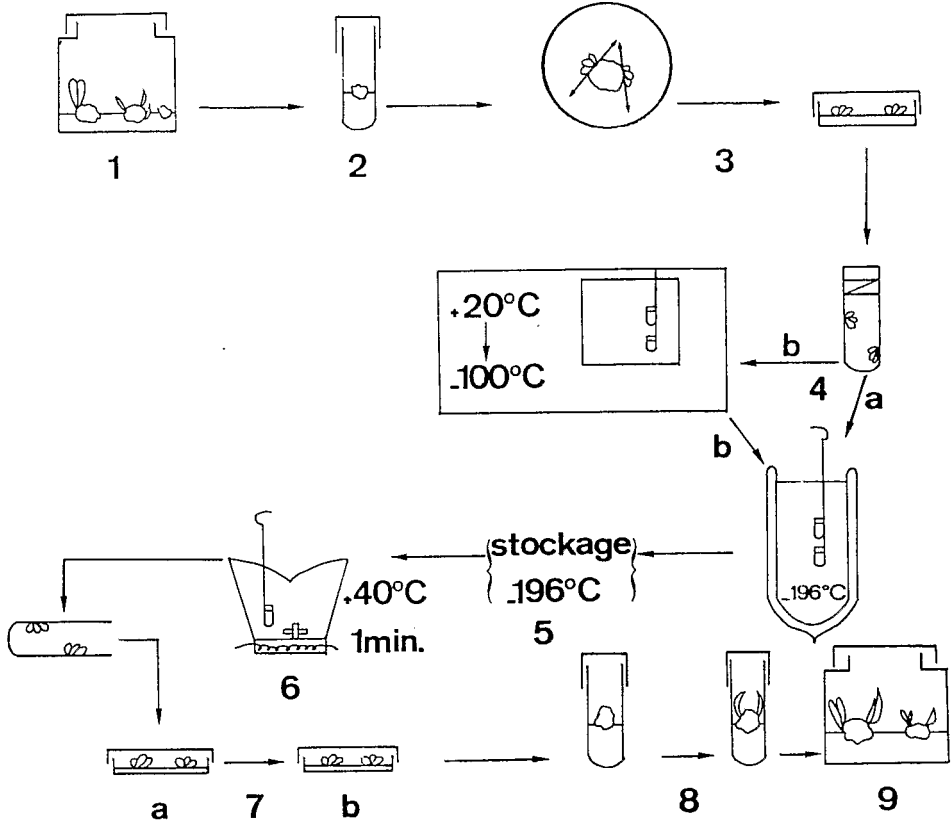


Fig. 1.- Schéma général du procédé de cryoconservation des embryoïdes de palmier à huile.

- 1) Matériel de départ : embryoïdes en multiplication.
- 2) Obtention de massifs d'embryoïdes pour la congélation : 2 mois en présence de saccharose 0,3 M.
- 3) Dissection des massifs et prétraitement de 7 jours sur du saccharose 0,75 M.
- 4) Refroidissement : a, rapide ; b, programmé.
- 5) Stockage dans l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).
- 6) Réchauffement : 1 min. à  $+40^{\circ}\text{C}$ .
- 7) Post-traitement : a, 1 semaine en présence de saccharose 0,3 M et de  $2,4\text{-D } 10^{-6}\text{ M}$  ; b, 2 semaines en présence de saccharose 0,1 M et de  $2,4\text{-D } 10^{-6}\text{ M}$ .
- 8) Repiquages successifs sur le milieu de multiplication : reprise de la prolifération.
- 9) Repiquage en bocal pour l'extension des cultures et la production de pousses feuillées issues de matériel congelé.

## RESULTATS

### Application à différents clones (Tableau 1).

La technique décrite précédemment a été appliquée à 27 clones. Le taux de survie moyen, mesuré à la fin du post-traitement, est de 41,1% et 12,5% des embryoïdes congelés reprennent effectivement leur prolifération.

L'échec de la cryoconservation avec 1 clone est dû au fait que, dans ce cas particulier, il avait été impossible d'obtenir le type recherché de jeunes embryoides susceptibles de résister à la congélation.

Tableau 1.- Taux de survie et de reprise moyens des 27 clones d'embryoïdes de palmier à huile cryoconservés.

NOMBRE DE CLONES CRYOCONSERVES	27
SURVIE MOYENNE (%)	41,1 (0-74,5)
REPRISE MOYENNE (%)	12,5 (0-33)

### Congélations successives (Tableau 2)

Lorsque des embryoides stockés dans l'azote liquide sont utilisés, ils doivent être remplacés le plus rapidement possible en utilisant une partie des cultures qui ont proliféré à partir des embryoides décongelés. Dans ce but, nous avons observé le taux de reprise de la prolifération de massifs obtenus à partir de matériel congelé 1, 2, 3 ou 4 fois. Il apparaît que les résultats ne sont pas modifiés significativement en fonction du nombre de cycles congélation-réchauffement subis par les cultures dont les embryoides sont issus.

Tableau 2.- Taux de survie et de reprise de massifs d'embryoïdes de palmier à huile en fonction du nombre de cycles congélation-réchauffement subis par les cultures dont ils sont issus.

		MASSIFS CONGELES	SURVIE (%)	REPRISE (%)
NOMBRE DE CYCLES	1	-----	80 (moyenne)	20 (moyenne)
	2	59	40,7	12,1
CONGÉLATION- RÉCHAUFFEMENT	3	78	86,0	21,3
	4	116	81,9	27,6

### Durée de stockage dans l'azote liquide (Tableau 3)

Il a été vérifié que l'augmentation de la durée de stockage dans l'azote liquide jusqu'à 12 mois (clone BC 156) ou 15 mois (clone BC 068) ne modifiait pas de manière significative le taux de reprise des embryoides.

Tableau 3.- Evolution du taux de survie et de reprise d'embryoïdes des clones BC 068 et BC 156 en fonction de la durée de leur stockage dans l'azote liquide.

	DUREE DE STOCKAGE	MASSIFS CONGELES	SURVIE (%)	REPRISE (%)
Clone BC 068	1 heure	63	42,4	20,0
	3 semaines	44	66,0	20,4
	7 mois	65	77,0	15,4
	15 mois	25	76,0	16,4
Clone BC 156	1 heure	30	30,0	13,3
	12 mois	51	74,5	23,5

### Production de vitroplants à partir d'embryoïdes congelés (Tableau 4)

Des plantules provenant d'embryoïdes cryoconservés des clones BC 068 et LMC 79 ont été envoyées à la Station de Recherches IRHO/CIRAD de la ME (Côte d'Ivoire). Leur enracinement ainsi que leur survie au cours du sevrage et de leur culture en pépinière se sont avérés équivalents à ceux de plantules témoins. Après transfert au champ, aucune différence dans le développement végétatif n'a pu être observée entre matériel témoin et congelé. Les premières inflorescences mâles, apparues récemment sur des palmiers provenant d'embryoïdes cryoconservés sont parfaitement normales. Des vitroplants produits à partir de 8 nouveaux clones cryoconservés sont actuellement en acclimatation en pré-pépinière. Ils seront plantés en champ afin de confirmer ces premières observations.

Tableau 4.- Enracinement et survie au sevrage et en pépinière de plants de palmier à huile des clones BC 068 et LMC 79 issus d'embryoïdes témoins (-AL) et cryoconservés (+AL).

		NOMBRE DE PLANTULES	ENRACINEMENT (%)	SEVRAGE (%)	PEPINIERE (%)
BC 068	-AL	110	80,0	73,6	56,3
	+AL	110	80,9	79,1	61,8
LMC 079	-AL	110	90,0	57,3	45,5
	+AL	110	92,7	55,4	31,8

### CONCLUSION

Cette technique de cryoconservation est donc fiable, puisque la reprise de la prolifération d'embryoïdes congelés a été obtenue de manière reproductible pour un grand nombre de clones. De plus, ce procédé est caractérisé par sa simplicité : les seules modifications apportées au milieu de culture sont une augmentation puis une diminution de la teneur en saccharose avant et après la congélation et l'addition transitoire de 2,4-D au cours du post-traitement. Enfin, cette technique est peu coûteuse : l'utilisation d'un congélateur programmable n'est pas indispensable, l'investissement en récipients de stockage et la consommation en azote liquide sont peu importants.

Ces résultats ont conduit l'ORSTOM et l'IRHO à installer des unités de cryoconservation dans les laboratoires produisant des vitroplants de palmier selon le procédé ORSTOM/IRHO. Les expérimentations ont commencé simultanément en Indonésie, Malaisie, Côte d'Ivoire et France. La première série de congélation portera sur environ 155 clones.

Les résultats seront disponibles en 1990. Nous aurons alors des informations concernant la possibilité d'utiliser en routine la cryoconservation pour le stockage à long terme des clones d'embryoïdes de palmier à huile.

### BIBLIOGRAPHIE

CORLEY R.H.V., C.H. LEE, I.H. LAW et C.I. WONG, 1986.- Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter*, 62, 233 - 240.

- ENGELMANN F et J. DEREUDDRE, 1988 a.- Cryopreservation of oil palm somatic embryos : importance of the freezing process. *Cryo-Letters*, **9**, 220 - 235.
- ENGELMANN F. et J. DEREUDDRE, 1988 b.- Effets du milieu de culture sur la production d'embryoïdes destinés à la cryoconservation chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **306**, Série III, 515 - 520.
- ENGELMANN F. et Y. DUVAL, 1986.- Cryoconservation d'embryons somatiques du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) : résultats et perspectives d'application. *Oléagineux*, **41**, 169 - 174.
- ENGELMANN F., Y. DUVAL et J. DEREUDDRE, 1985.- Survie et prolifération d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) après congélation dans l'azote liquide. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **301**, Série III, 111 - 116.
- HANOWER J et C. PANNETIER, 1982.- *In vitro* vegetative of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. In Proc. 5<sup>th</sup> Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Fujiwara A. éd. Tokyo, 745 - 746.
- LARKIN P.J. et W.R. SCOWCROFT, 1981.- Somaclonal variation : a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, **60**, 197 - 214.
- PANNETIER C., P. ARTHUIS et D. LIEVOUX, 1981.- Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oléagineux*, **36**, 119 - 122.