

# Développement de la cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile, avec un procédé amélioré

## *Development of cryopreservation for oil palm somatic embryos using an improved process*

D. DUMET<sup>(1)</sup>, F. ENGELMANN<sup>(1)</sup>, N. CHABRILLANGE<sup>(1)</sup>, F. RICHAUD<sup>(1)</sup>,  
T. BEULE<sup>(1)</sup>, T. DURAND-GASSELIN<sup>(2)</sup> et Y. DUVAL<sup>(1)</sup>

**Résumé.** — Un nouveau procédé de cryoconservation comprenant une étape de dessiccation au silicagel avant la congélation dans l'azote liquide a été développé pour les embryons somatiques standards de palmier à huile. Il a été appliqué avec succès en France et en Côte-d'Ivoire à 39 clones différents. La survie après cryoconservation a été obtenue avec tous les clones, avec des taux variant entre 2 et 100%. Les clones ayant un aspect morphologique normal ont présenté un taux de survie significativement plus élevé (34% en moyenne) que ceux en mauvais état physiologique (12% en moyenne). La cryoconservation est maintenant appliquée en routine aux embryons somatiques de palmier à huile avec ce procédé amélioré.

**Mots clés.** — Palmier à huile, embryons somatiques, cryoconservation, dessiccation, silicagel.

**Abstract.** — A new cryopreservation process, including a desiccation step with silica gel prior to freezing in liquid nitrogen was developed with standard oil palm somatic embryos. It was successfully applied in France and Ivory Coast to a total of 39 different clones. Survival after cryopreservation was obtained with all clones and ranged between 2 and 100%. Clones displaying a normal morphological aspect had a significantly higher survival rate (average of 34%) than those in a poorer condition (average of 12%). Cryopreservation is now routinely applied with oil palm somatic embryos using this improved procedure.

**Key words.** — Oil palm, somatic embryos, cryopreservation, desiccation, silica gel.

### INTRODUCTION

Les recherches pour le développement d'un procédé de cryoconservation pour les embryons somatiques de palmier à huile ont débuté en 1984, lorsque les laboratoires produisant des clones à grande échelle ont été confrontés à des problèmes de gestion dus au nombre croissant de clones créés. La cryoconservation (conservation dans l'azote liquide, -196 °C) est à l'heure actuelle la seule méthode permettant d'assurer la conservation à long terme des ressources génétiques végétales. Un protocole de cryoconservation a été mis au point (Engelmann *et al.*, 1985) qui comprenait les étapes suivantes :

- production d'un type particulier d'embryons, des embryons fusiformes, par une culture de deux mois sur un milieu contenant 0,3M de saccharose (Engelmann et Dereuddre, 1988) ;
- prétraitement de 7 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose ;
- congélation rapide suivie d'un réchauffement rapide ;
- reprise sur des milieux progressivement appauvris en saccharose, additionnés d'une faible quantité d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) ;

(1) ORSTOM/CIRAD - Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, BP 5035 - 34032 Montpellier cedex (France)

(2) CIRAD-CP, IDEFOR-DPO, station principale de La Mé, 13 BP 989 Abidjan 13, (Côte-d'Ivoire)

### INTRODUCTION

Research for the development of a cryopreservation process for oil palm somatic embryos started in 1984, when laboratories producing clonal oil palms on a large scale were faced with management problems induced by the increasing number of clones produced. Cryopreservation (storage in liquid nitrogen, -196 °C) is the only current method allowing long-term conservation of plant germplasm. A cryopreservation protocol was set up (Engelmann *et al.*, 1985) which comprized the following successive steps:

- production of a particular type of material, finger shaped embryos, by a two-month culture on a medium supplemented with 0.3M sucrose (Engelmann and Dereuddre, 1988);
- pretreatment for 7 days on a medium containing 0.75M sucrose;
- rapid freezing in liquid nitrogen followed by rapid thawing;
- recovery on media with progressively lowered sucrose concentrations, supplemented with a low concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D);

(1) ORSTOM/CIRAD - Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, BP 5035 - 34032 Montpellier cedex (France)

(2) CIRAD-CP, IDEFOR-DPO, station principale de La Mé, 13 BP 989 Abidjan 13, (Ivory Coast)

ORSTOM Fonds Documentaire

29 OCT. 1993

N° 38.622 ex 1  
Cote B M P36

- repiquage sur milieu standard dépourvu de régulateurs de croissance pour la multiplication des embryons et la production de pousses feuillées, suivant le procédé ORSTOM/IRHO standard (Pan

- *transfer onto standard medium devoid of growth regulators for multiplication of embryos and production of plantlets, according to the standard ORSTOM/IRHO process (Pannatier et al. 1981)*

heure dans l'azote liquide, les embryons ont été réchauffés rapidement en plongeant les cryotubes pendant 2 minutes dans un bain-marie thermostaté à 40 °C. Ils ont ensuite été placés pendant une semaine dans des boîtes de Petri contenant 10 ml de milieu de culture additionné de 0,3M de saccharose et 0,2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D puis transférés sur le même milieu avec une concentration en saccharose réduite (0,1M). Après deux semaines, les embryons ont été placés sur le milieu standard sans régulateurs de croissance puis repiqués tous les mois pour la reprise de leur prolifération et la production de pousses feuillées.

La reprise de prolifération a été observée trois semaines après le réchauffement en comptant le nombre de massifs sur lesquels de nouveaux embryons adventifs étaient apparus. Le nombre de massifs utilisés variait entre 5 et 105, selon les essais. Trois séries d'expérimentations ont été réalisées, deux à l'ORSTOM/Montpellier et une à l'IDEFOR-DPO (Côte-d'Ivoire). Pour la première série d'essais effectuée à Montpellier, les dix clones utilisés avaient été repiqués régulièrement et présentaient donc un aspect morphologique normal (Fig. 1). Le matériel employé en Côte-d'Ivoire était également en bon état. L'essai complémentaire réalisé à Montpellier avait pour but d'évaluer l'effet de l'état physiologique des embryons sur leur potentiel de reprise après la cryoconservation. Dix-neuf clones supplémentaires ont ainsi été cultivés intentionnellement dans des conditions non optimales : les repiquages ont été retardés et effectués à des intervalles irréguliers. Les cultures avaient ainsi un taux de prolifération faible, présentaient de nombreuses structures hyperhydriques, des nécroses et des brunissements dus à la production de composés phénoliques.

## RESULTATS

Dans la première série d'essais, la teneur en eau moyenne des massifs était de 24%, variant de 19 à 36% (Tabl. I). Aucune relation entre la survie après dessiccation ou congélation et la teneur en eau n'a été mise en évidence. La survie

*hour storage in liquid nitrogen, embryos were thawed rapidly by immersing the cryotubes for 2 min in a water-bath thermostated at 40 °C. They were then placed for one week in Petri dishes containing 10 ml of recovery medium supplemented with 0.3M sucrose and 0.2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D and then transferred onto the same medium with reduced sucrose content (0.1M). After two weeks, embryos were placed onto standard culture medium devoid of growth regulators and subcultured monthly for proliferation recovery and production of plantlets.*

*Recovery was recorded three weeks after thawing, by counting the number of clumps on which new adventitious embryos had appeared. The number of clumps used varied between 5 and 105, depending on the experiments. Three sets of experiments were performed, two in ORSTOM/Montpellier and one in IDEFOR-DPO, Ivory Coast. In Montpellier, the first set of experiments used 10 clones which had been subcultured regularly and displayed thus a normal morphological aspect (Fig. 1). Material used in Ivory Coast was also in a good state. The additional experiment performed in Montpellier aimed at evaluating the effect of the physiological state of the embryos on their recovery potential after cryopreservation. Nineteen additional clones were on purpose cultivated in non-optimal conditions: transfers were delayed and performed at irregular intervals. Thus, cultures had a low proliferation rate and appearance of hyperhydric structures as well as numerous necroses and browning due to phenolic compounds were noted.*

## RESULTS

*In the first set of experiments, the average water content of clumps was 24% ranging from 19 to 36% (Table I). There was no relation ship between survival after desiccation or freezing and water content. Survival of clumps after desic-*

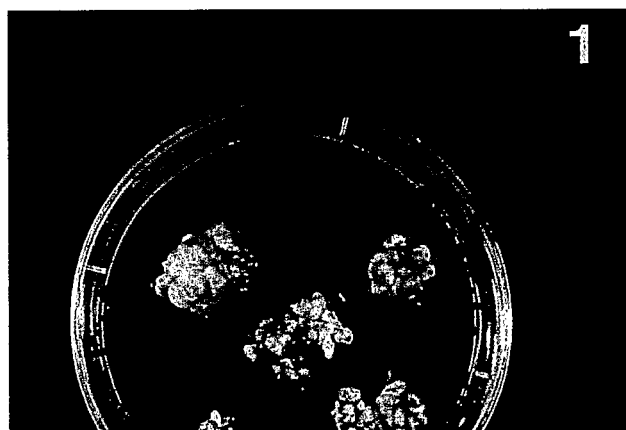


TABLEAU II. — Teneur en eau (% du poids frais initial) et survie (donnée en % entre parenthèses) d'embryons somatiques de palmier à huile déshydratés (-LN) et cryoconservés (+LN). Essais réalisés à l'IDEFOR/DPO, Côte-d'Ivoire. — (*Water content - % of initial fresh weight - and survival - indicated in % between brackets - of desiccated control (-LN) and cryopreserved (+LN) oil palm somatic embryos. Experiments performed at IDEFOR/DPO, Ivory Coast*)

Clone N°	Teneur en eau ( <i>Water content</i> ) %	Survie ( <i>Survival</i> )	
		-LN	+LN
LMC 22	26	6/25 (24)	7/50 (14)
LMC 44	23	14/30 (47)	16/54 (30)
LMC 51	22	17/40 (43)	20/85 (24)
LMC 63	29	40/40 (100)	11/105 (10)
LMC 119	23	25/25 (100)	49/90 (54)
LMC 169	21	20/20 (100)	29/75 (39)
LMC 242	19	11/20 (55)	27/50 (54)
LMC 246	22	4/5 (80)	8/50 (16)
LMC 248	29	1/10 (10)	15/40 (38)
LMC 249	26	10/25 (40)	20/50 (40)

TABLEAU III. — Survie (indiquée en % entre parenthèses) d'embryons somatiques de palmier à huile cryoconservés. Deuxième série d'essais réalisés à l'ORSTOM/Montpellier — (*Survival - indicated in % between brackets - of cryopreserved oil palm somatic embryos. Second set of experiments performed at ORSTOM/Montpellier*)

Clone N°	TRL 13	TRL 14	TRL 17	TRL 22	TRL 25	TRL 26	TRL 28	TRL 47	TRL 55	TRL 57
Survie ( <i>Survival</i> ) (%)	14/79 (18)	3/47 (6)	5/43 (12)	6/50 (12)	1/34 (3)	3/36 (8)	1/35 (3)	4/32 (13)	7/35 (20)	5/49 (10)

difient en une structure vitreuse amorphe), ce qui évite ainsi les effets destructeurs de la cristallisation sur les structures cellulaires.

En conclusion, l'application en routine de la cryoconservation est maintenant possible pour les embryons somatiques de palmier à huile avec ce procédé amélioré. Il est préférable d'utiliser les cultures quand elles sont dans un état morphologique et physiologique optimal. Cependant, cette technique peut être employée même avec des cultures dans un état non optimal. Ce procédé est en cours d'application pour tous les clones multipliés à l'ORSTOM/Montpellier et à l'IDEFOR (Côte-d'Ivoire). Le palmier à huile représente donc toujours le premier exemple d'application en routine de la cryoconservation à une espèce végétale multipliée *in vitro*.

**Remerciements.** — Les auteurs remercient V. Leruste pour son aide précieuse lors de la deuxième série d'essais

*solidified into an amorphous glassy state), thus avoiding detrimental effects of intracellular crystallization to cell structures.*

*In conclusion, routine application of cryopreservation to oil palm somatic embryos is now easily feasible using this improved process. Cultures should be used when they are in an optimal morphological and physiological state in order to ensure higher survival rates. However, this technique is applicable even to cultures in a non optimal condition. This process is being applied presently to all clones multiplied in ORSTOM/Montpellier and IDEFOR (Ivory Coast). Therefore oil palm still represents the first example of routine application of cryopreservation to plants cultivated in vitro.*

**Acknowledgements.** — The authors wish to thank V. Leruste for her valuable help in the second set of cryopreservation