

# Utilisation des techniques de cryoconservation pour la création de banques d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) (1)

F. ENGELMANN (2), Y. DUVAL (3) et C. PANNETIER (3)

**Résumé.** — La technique de cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile, mise au point récemment par Engelmann et Duval (1986) [1], assure la reprise de 10 à 30 p. 100 des embryoides congelés. Des résultats similaires ont été observés avec des embryoides stockés 15 mois dans l'azote liquide. Des plantules obtenues à partir de matériel cryoconservé ont été plantées en pépinière à la Station IRHO-CIRAD de La Mé (Côte d'Ivoire). Leur développement est normal jusqu'à présent. La cryoconservation semble applicable dès maintenant pour le stockage des lignées d'embryoides produites par culture *in vitro*. L'utilisation de cette technique, qui est sûre, peu coûteuse et facile à mettre en œuvre, permettra de réduire les risques de variabilité dus à la culture *in vitro* et facilitera la gestion des laboratoires qui produisent des vitro-plants de palmier à huile.

## INTRODUCTION

Le procédé de multiplication *in vitro* du palmier à huile mis au point par l'ORSTOM et l'IRHO, qui utilise l'embryogenèse somatique, est en cours d'application à l'échelle industrielle [2].

Le maintien de matériel en culture *in vitro* pendant plusieurs années présente des risques pour la stabilité génétique des cultures [3, 4]. Ceci a été illustré récemment, dans le cas du palmier à huile, par Corley *et al.* [5]. En effet, ces auteurs indiquent que, si les premiers palmiers produits par culture *in vitro* présentent un développement floral normal, les sujets provenant des mêmes cultures entretenues *in vitro* pendant 3 ans présentent un développement floral anormal dans 88 à 95 p. 100 des cas, selon les clones. Ces observations semblent liées aux conditions de la partie *in vitro* du procédé de multiplication, et plus particulièrement à l'emploi de régulateurs de croissance exogènes.

Les clones d'embryoides produits par l'ORSTOM et l'IRHO sont entretenus depuis plusieurs années sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance et tous les palmiers produits selon le procédé ORSTOM-IRHO présentent un développement normal. Cependant, la création régulière de nouveaux clones pose des problèmes pratiques de gestion des laboratoires. En effet, l'entretien des cultures nécessite des repiquages réguliers et cet apport constant de matériel *in vitro* implique une augmentation de la surface des salles de culture, des coûts en main-d'œuvre et en matériel. Enfin, les cultures ne sont pas à l'abri des risques de contamination.

La seule méthode susceptible d'assurer à la fois le maintien des caractéristiques des cultures et leur stockage dans

un faible volume et à l'abri des contaminations est la cryoconservation, c'est-à-dire la conservation à très basse température, généralement celle de l'azote liquide ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A cette température, les divisions cellulaires sont arrêtées et tous les processus métaboliques sont bloqués [6]. Le matériel végétal peut ainsi être conservé sans altérations ni modifications pendant une durée théoriquement illimitée. En plus de son utilisation pour le stockage du matériel produit par culture *in vitro*, seule la cryoconservation peut permettre la conservation à long terme des ressources génétiques du palmier à huile. Une méthode de cryoconservation a été mise au point pour cette espèce [7, 1], en utilisant des explants à différents stades de développement, embryoides en multiplication et structures embryogènes (Fig. 1). Cet article fait le point des résultats obtenus et de leurs possibles applications.

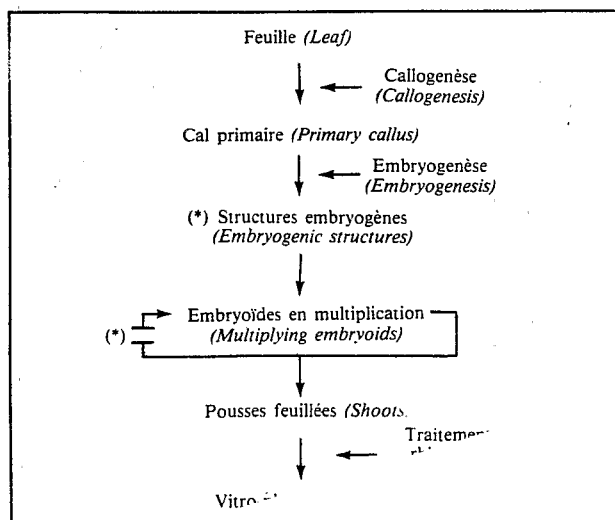


FIG. 1

(1) Communication présentée aux « 1987 International oil palm/palm oil Conferences, Progress and prospects », 23-26 juin 1987 à Kuala Lumpur (Malaisie).

(2) IRHO-CIRAD, Laboratoire de Physiologie des organes végétaux après récolte, CNRS, 4<sup>ter</sup>, route des Gardes, 92195 Meudon (France).

(3) IRHO-CIRAD, Laboratoire de Physiologie végétale, Services scientifiques centraux de l'ORSTOM, 72-74, route d'Aulnay, 93140 (France).



## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal.

Deux clones ont principalement été utilisés : l'un provenant d'un plant de pépinière, l'autre issu d'un arbre adulte sélectionné. Les cultures d'embryoïdes ont été produites par l'ORSTOM-IRHO à Bondy (France) par une méthode décrite précédemment [8, 9].

Seuls de très jeunes embryoïdes sont susceptibles de résister à la congélation, après une déshydratation partielle préalable [10, 11]. Ce type d'embryoïdes, rarement observé dans les cultures sur milieu standard, a été obtenu avec une fréquence élevée après une culture de 2 mois sur un milieu enrichi en saccharose (Fig. 2).

### Méthode de congélation.

— *Prétraitement* : les massifs d'embryoïdes ont été placés en boîtes de Petri pendant 7 jours, sur un milieu gélosé contenant 0,75 M de saccharose.

— *Congélation* : les massifs d'embryoïdes ont été placés dans des cryotubes stériles de 2 ml.

• *Congélation rapide* ( $200\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) : immersion directe des cryotubes dans l'azote liquide.

• *Congélation en 2 étapes* : refroidissement contrôlé de  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  à  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , réalisé au moyen d'un congélateur programmable (type Minicool, commercialisé par l'Air Liquide), suivi par l'immersion des cryotubes dans l'azote liquide. Les vitesses de congélation expérimentées ont varié de  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  à  $40\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

— *Réchauffement* : après stockage dans l'azote liquide, les massifs d'embryoïdes ont été réchauffés en plongeant les ampoules pendant 1 min dans un bain-marie thermostaté à  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

— *Post-traitement* : les embryoïdes ont été cultivés pendant 3 semaines en boîtes de Petri sur des milieux additionnés d'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) progressivement appauvris en saccharose. Les massifs d'embryoïdes ont ensuite été transférés sur le milieu standard dépourvu d'auxine.

## RÉSULTATS

### 1) Cryoconservation des embryoïdes en multiplication et des structures embryogènes.

#### — *Embryoïdes en multiplication.*

• *Congélation rapide* : avec cette technique, des taux de survie de 50 à 80 p. 100 des embryoïdes congelés ont été régulièrement obtenus. Une expérimentation en cours sur 12 clones provenant de 7 croisements différents donne un taux de survie moyen de 50 p. 100. La reprise de la multiplication, obtenue sur 10 à 20 p. 100 des massifs d'embryoïdes est observée 2 mois après leur réchauffement (Fig. 3, 4). L'adjonction de 2,4-D au milieu de culture, après la décongélation, pendant une période brève, est obligatoire pour obtenir régulièrement une reprise de la multiplication. En l'absence d'auxine, on assiste dans quelques cas au développement d'un embryoïde en pousse feuillée et la reprise de la prolifération n'est observée que de manière exceptionnelle et aléatoire.

• *Congélation en 2 étapes* : des vitesses de refroidissements comprises entre  $5$  et  $40\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  ont permis d'obtenir régulièrement des résultats équivalents à ceux décrits précédemment : taux de survie compris entre 50 et 80 p. 100 et reprise de la multiplication de 6 à 23 p. 100 du matériel congelé, suivant le clone et la vitesse de congélation. L'avantage présenté par l'emploi d'un congélateur programmable est de permettre l'obtention de vitesses de congélation précises et parfaitement reproductibles d'un essai à l'autre, ce qui n'est pas forcément le cas avec la technique de congélation rapide.

• *Durée de stockage dans l'azote liquide* : la reprise de la prolifération a été obtenue à partir d'embryoïdes d'un clone stockés 7 et 15 mois dans l'azote liquide, sans que l'on observe de variations du taux de reprise (15 et 16 p. 100 respectivement).

#### — *Structures embryogènes.*

Une expérience de congélation a aussi été réalisée sur ce type de matériel en utilisant la première méthode décrite (congélation rapide à  $200\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). La reprise de la prolifération a été obtenue sur 20 p. 100 des massifs congelés,



FIG. 2. — Massifs de jeunes embryoïdes somatiques (flèche) obtenus après 2 mois de culture sur le milieu standard enrichi en saccharose (Clumps of young somatic embryos — arrow) — obtained after 2 months of culture on the standard medium enriched with sucrose).

FIG. 3. — Neoformation des premiers embryoides (flèches) 15 jours après le réchauffement (Neoformation of the first embryoids — arrows — 15 days after thawing)

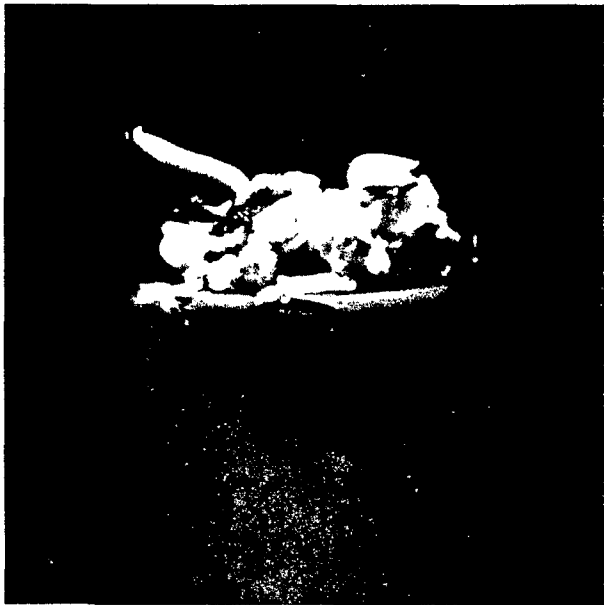


FIG. 4. — Reprise de l'embryogenèse adventive, 2 mois après le réchauffement (Resumption of adventitious embryogenesis 2 months after thawing).

sans qu'il soit nécessaire d'incorporer du 2,4-D au milieu de culture pendant le post-traitement.

## 2) Production de vitro-plants à partir de matériel congelé.

Les cultures obtenues à partir des massifs d'embryoïdes congelés ont subi plusieurs cycles de multiplication avant l'isolement de pousses feuillées d'une taille suffisante pour subir un traitement inducteur de la rhizogenèse. Après ce traitement, les vitro-plants ont été acclimatés en serre.

Des pousses feuillées de 2 clones, l'un congelé au stade « embryoïdes en multiplication » et stocké 7 mois dans l'azote liquide, l'autre congelé au stade « structures embryogènes » (Fig. 1) ont été envoyés à la Station de Recherche IRHO-CIRAD de La Mé (Côte d'Ivoire). Ces pousses feuillées ont été enracinées et transférées en pépinière. L'enracinement et le développement des vitro-plants provenant de matériel cryoconservé sont comparables, pour les 2 clones, à ceux de vitro-plants issus d'embryoïdes non congelés. Les observations seront poursuivies après leur transfert en conditions naturelles, pour vérifier la conformité des vitro-plants provenant d'embryoïdes cryoconservés.

## DISCUSSION, CONCLUSION

La méthode de cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile décrite dans cet article permet d'obtenir de manière reproductible la reprise de la prolifération de matériel congelé. Les vitro-plants issus d'embryoïdes congelés ont un développement comparable à celui de vitro-plants provenant de matériel non congelé. L'augmentation de la durée de stockage dans l'azote liquide à 7 et 15 mois n'a pas d'effet sur le taux de reprise des embryoïdes. L'application de cette technique à un nombre de clones plus important semble confirmer ces résultats.

Ce procédé est caractérisé par sa simplicité : les seules modifications du milieu de culture consistent en une augmentation puis une diminution de sa concentration en saccharose, avant et après la congélation et en l'addition de 2,4-D pendant une durée très brève lors du post-traitement des embryoïdes en multiplication. Par contre, l'utilisation de cette auxine ne s'avère plus nécessaire pour induire la reprise de la prolifération de structures embryogènes après leur réchauffement. De plus, cette technique est peu onéreuse : l'utilisation d'un congélateur programmable n'est pas absolument nécessaire, même si elle est fortement recommandée afin d'assurer une meilleure reproductibilité des conditions expérimentales. L'investissement en récipients de stockage et le coût de leur approvisionnement régulier en azote liquide sont peu élevés.

Diverses améliorations du procédé doivent être recherchées afin d'en augmenter l'efficacité. La taille des massifs d'embryoïdes doit être réduite pour éviter la cristallisation, létale pour les cellules, de l'eau intracellulaire pendant la congélation et le réchauffement. L'utilisation de 2,4-D pendant le post-traitement des embryoïdes devra être évitée pour supprimer les effets déstabilisants de cette substance au niveau génétique. De nouvelles expériences devraient être réalisées avec des structures embryogènes dont l'intérêt, par rapport aux embryoïdes en multiplication, réside dans le fait que l'adjonction d'auxine n'est plus nécessaire après leur décongélation pour obtenir la reprise de leur prolifération. De plus, la durée de culture *in vitro* de ces structures est inférieure à celle des embryoïdes en multiplication (Fig. 1), ce qui diminue les risques de variations génétiques. En conclusion, il est dès à présent possible d'utiliser cette technique pour le stockage à long terme de

matériel important, sans attendre d'éventuelles améliorations du procédé, puisque l'on sait régénérer des vitropants à partir d'embryoïdes en multiplication et de structures embryogènes après leur conservation dans l'azote liquide. Enfin, cette méthode pourrait être appliquée à la conservation des embryons zygotiques de palmier à huile, dont la cryoconservation est réalisable [12] et à celle des embryons zygotiques de cocotier pour lesquels une technique de culture *in vitro* a été mise au point [13].

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ENGELMANN F. et DUVAL Y. (1986). — Cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) : résultats et perspectives d'applications (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 41, N° 8, p. 169-174.
- [2] NOIRET J. M., GASCÓN J. P. et PANNETIER C. (1985). — La production de palmier à huile par culture *in vitro* (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 40, n° 7, p. 365-372.
- [3] BAYLISS M. W. (1980). — Chromosomal variation in plant tissues in culture. *Int. Rev. Cytol. Suppl.*, 11A, p. 113-144.
- [4] REISCH B. (1984). — Genetic variability in regenerated plants. *Handbook of plant cell culture, techniques for propagation*, Vol. 1, Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V. et Yamada Y., Eds. Mac Millan, New York, USA, p. 748-769.
- [5] CORLEY R. H. V., LEE C. H., LAW I. H. et WONG C. I. (1986). — Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter*, 62, p. 233-240.
- [6] KARTHA K. K. (1981). — Gene pool conservation through tissue culture. *Proc. Costed Symp. on Tissue culture of economically important plants*, Rao A. N. Ed., Singapore, p. 213-218, Singapore.
- [7] ENGELMANN F., DUVAL Y. et DEREUDDRE J. (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, Sér. III, p. 111-116.
- [8] PANNETIER C., ARTHUIS P. et LIÉVOUX D. (1981). — Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro* (trilingue fr.-angl.-esp.). *Oléagineux*, 36, N° 3, p. 119-122.
- [9] HANOWER J. et PANNETIER C. (1982). — *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. *Proc. 5th Int. Congr. Plant tissue and cell culture*, Fujiwara A. Ed., Tokyo, p. 745-746.
- [10] WITHERS L. A. (1980). — Tissue culture storage for genetic conservation. *IBPGR Report*, Rome, 91 p.
- [11] HENSHAW G. G. (1982). — Tissue culture methods and germplasm storage. *Proc. 5th Int. Congr. Plant tissue and cell culture*, Fujiwara A. Ed., Tokyo, p. 789-792.
- [12] GROUT B. W. W., SHELTON K. et PRITCHARD H. W. (1983). — Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann. Bot.*, 52, p. 381-384.
- [13] ASSY BAH B. (1986). — Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotiers (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 41, N° 7, p. 321-328.

## SUMMARY

### Use of cryopreservation for setting up a bank of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos.

F. ENGELMANN, Y. DUVAL and C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 8-9, p. 323-328.

The oil palm somatic embryo cryopreservation technique which was recently developed by Engelmann and Duval (1986) [1] ensures the regular resumption of 10 to 30 p. 100 of frozen embryoïds. The same results have been observed with embryoïds stored for 15 months in liquid nitrogen. Plantlets obtained from frozen material are now growing in the IRHO-CIRAD La Mé Research Station nursery, Côte d'Ivoire. So far their development has been normal. From now onwards cryopreservation seems applicable to the storage of embryoïd strains produced by *in vitro* culture. The use of this process, which is reliable, inexpensive, and easy to employ, will reduce the risks of variability due to *in vitro* culture and facilitate the management of the laboratories producing clonal plantlets of oil palm.

## RESUMEN

### Utilización de las técnicas de crioconservación para la creación de bancos de embriones somáticos de palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.).

F. ENGELMANN, Y. DUVAL y C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 8-9, p. 323-328.

Engelmann y Duval (1986) [1] desarrollado recientemente la técnica de crioconservación de embriones somáticos de palma africana, que permite el crecimiento de un 10 a un 30 p. 100 de embryoïdes congelados. Resultados similares han sido observados con embryoïdes almacenados en nitrógeno líquido durante 15 meses. Unas plántulas obtenidas a partir de material crioconservado se plantaron en semillero en la Estación IRHO-CIRAD de La Mé (Côte d'Ivoire), siendo su desarrollo normal hasta la fecha. La crioconservación parece poder aplicarse desde ahora en el almacenamiento de líneas de embryoïdes producidas por cultivo *in vitro*. La utilización de esta técnica, que es segura, poco costosa y fácil de establecer, permitirá disminuir el riesgo de variabilidad por el cultivo *in vitro*, facilitando además la gestión de los laboratorios que producen plántulas *in vitro* de palma africana.

# Use of cryopreservation for setting up a bank of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos (1)

F. ENGELMANN (2), Y. DUVAL (3) and C. PANNETIER (3)

## INTRODUCTION

The oil palm *in vitro* vegetative propagation process developed by ORSTOM/IRHO, which uses somatic embryogenesis, will soon be applied on an industrial scale [2]. Keeping material *in vitro* over many years is likely to undermine its genetic stability [3, 4]. This point was recently illustrated, in the case of oil palm, by Corley *et al.* [5]. In effect, these authors indicate that, if the first palms produced by *in vitro* culture show no abnormal flower development, the palms originating from the same cultures maintained *in vitro* for 3 years show abnormal flower development in 88 to 95 p. 100 of the cases, depending on the clone. These observations seem linked to culture conditions at the *in vitro* stage, especially when exogenous growth regulators are used.

The embryoid clones produced by ORSTOM-IRHO have been subcultured on a medium devoid of growth hormones for several years and all the palms produced using the ORSTOM-IRHO technique show normal development. On the other hand, the continuous creation of new clones gives rise to laboratory management problems. In effect, maintaining cultures necessitates regular transfers and this constant increase in *in vitro* material requires additional culture room space and more outlay in labor and equipment. Finally, cultures are not completely sheltered from the risks of contamination.

The only method likely to ensure genetic stability and enable limited contamination-free storage is cryopreservation, i.e. preservation at a very low temperature, usually that of liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). At this temperature, cells no longer divide and all metabolic processes are stopped [6]. Hence, planting material can be preserved without changes or modifications over a theoretically unlimited period of time. In addition to using cryopreservation for the storage of material produced by *in vitro* culture, only this technique can ensure the long-term preservation of oil palm genetic resources. A method of cryopreservation has been developed for this species [7, 1] using explants at various developmental stages, i.e. multiplying embryoids and embryogenic structures (Fig. 1). This paper summarizes the results obtained and their possible applications.

## MATERIAL AND METHODS

### Planting material.

Two clones were principally used: one obtained from a nursery seedling, the other from an elite palm. The embryoid cultures were produced by ORSTOM-IRHO at Bondy (France) using a method already described [8, 9].

Only very young embryoids are likely to with-stand freezing after previous partial dehydration [10, 11]. This type of embryoids, infrequently found in cultures on standard medium, is obtained at a high frequency rate after a two month culture on a medium enriched with sucrose (Fig. 2).

### Freezing method.

— **Pretreatment**: the clumps of embryoids were placed in Petri dishes for 7 days, on a semi-solid medium containing sucrose 0.75 M.

— **Freezing**: the clumps of embryoids were placed in sterile 2 ml cryobiological ampoules.

• **Rapid freezing** ( $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ): direct immersion of the cryobiological ampoules into liquid nitrogen.

• **Two-step freezing**: controlled freezing from  $+20^{\circ}\text{C}$  to  $-100^{\circ}\text{C}$ , carried out by using a programmable freezer (Minicool type l'Air Liquide) followed by immersion of the ampoules in liquid nitrogen. The freezing rates ranged from  $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  to  $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

— **Thawing**: after storage in liquid nitrogen, the samples were thawed by plunging the ampoules for 1 min in a waterbath kept at  $40^{\circ}\text{C}$ .

— **Post-treatment**: the embryoids were cultured for 3 weeks in Petri dishes on media enriched with 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), whilst the sugar content was gradually reduced. They were then transferred to the standard medium without auxin.

## RESULTS

### 1) Cryopreservation of multiplying embryoids and embryogenic structures.

#### — Multiplying embryoids.

• **Rapid freezing**: this technique regularly gave embryoid rates of 50 to 80 p. 100. An experiment which is in progress on 12 clones originating from 7 different crosses gives an average survival rate of 50 p. 100. Renewed multiplication, observed on 10-20 p. 100 of the embryoid clumps, was noted 2 months after thawing (Fig. 3, 4). Adding 2,4-D to the culture medium for a short period after freezing is essential to ensure a regular resumption of multiplication. Without auxin, a few embryoids developed into shoots and in these cases, resumed multiplication was exceptional and uncertain.

• **Two-step freezing**: freezing rates between 5 and  $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  regularly gave results similar to those above: survival rates from 50 to 80 p. 100 and resumption of multiplication from 6 to 23 p. 100, depending on the clone observed and the cooling rate. The advantage of using a programmable freezer is that **exact and perfectly reproducible freezing rates** can be obtained from one trial to the next, which is not always the case with the rapid freezing technique.

• **Storage time in liquid nitrogen**: resumed multiplication was observed on embryoids obtained from one of the two clones after 7 and 15 months in liquid nitrogen, without variations in the resumption rate (15 and 16 p. 100 respectively).

#### — Embryogenic structures.

A freezing experiment was also carried out on embryogenic structures, using the first method (rapid freezing at  $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Resumed multiplication was observed on 20 p. 100 of the frozen clumps, **even without adding 2,4-D to the culture medium during post-treatment.**

(1) Communication presented at « 1987 International oil palm/palm oil conferences, Progress and prospects », 23-26 June 1987, Kuala Lumpur (Malaysia).

(2) IRHO-CIRAD, Post harvest plant organs physiology Laboratory, CNRS, 4<sup>ter</sup>, route des Gardes, 92195 Meudon (France).

(3) IRHO-CIRAD, Plant physiology Laboratory, Orstom Central Scientific Services, 72-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

## 2) Production of plantlets from frozen material.

Cultures obtained from frozen material went through several multiplication cycles before sufficiently large shoots could be isolated. They then underwent a rooting treatment and were acclimatized in a greenhouse.


Shoots from 2 clones, one frozen at the « multiplying embryoid » stage and stored for 7 months in liquid nitrogen, the other frozen at the « embryogenic structure » stage (Fig. 1) were sent to the IRHO-CIRAD La Mé Research Station (Côte d'Ivoire). They were rooted and transferred to the nursery. The rooting and development of the plantlets originating from cryopreserved material are comparable, for both clones, to those of clonal plantlets originating from non-frozen material. The observations will be continued after their transfer to natural conditions, in order to check whether the plantlets produced from cryopreserved embryoids are true to type.

## DISCUSSION-CONCLUSION


The oil palm somatic embryoid cryopreservation method described in this paper ensures the **reproducible** resumption of frozen material. The plantlets produced from cryopreserved embryoids have a development which is comparable to that of non-frozen clonal plantlets. The extension of the storage time in liquid nitrogen to 7 and 15 months has no effect on the recovery rate of the embryoids. Applying this technique to a larger number of clones seems to confirm these results.

This process is characterized by its simplicity : the only modifications made to the culture medium are the increase and decrease of the sucrose content before and after freezing and the addition of 2,4-D for a very short period during multiplying embryoid post-treatment. On the contrary, the use of this auxin is no longer required after thawing to re-induce the multiplication of embryogenic structures. Moreover, this technique is inexpensive : the use of a programmable freezer is not absolutely necessary, even if it is recommended to ensure better reproducibility of experimental conditions. The investment in storage containers and the cost of replenishing them with liquid nitrogen is very low.

Various improvements made to the process have to be sought in order to increase its efficiency. The size of the embryoid clumps could be reduced to avoid lethal crystallization of the intracellular water during freezing and thawing. The use of 2,4-D during the embryoid post-treatment should be avoided to suppress the genetic side-effects provoked by this substance. New experiments should be carried out on embryogenic structures, whose merit, in comparison to multiplying embryoids, lies in the fact that auxin is not required after thawing to obtain resumed multiplication. Furthermore, the time spent *in vitro* to obtain these embryogenic structures is shorter than that required for embryoids (Fig. 1), which reduces the risks of genetic variations. To conclude, it is possible to use this technique for the long-term storage of valuable germplasm from now onwards, even before improvements to the process are made, since we are able to regenerate plantlets from multiplying embryoids and embryogenic structures after their storage in liquid nitrogen. Finally, this method could be applied to the preservation of oil palm zygotic embryos, whose cryopreservation is feasible [12] and to that of coconut zygotic embryos, whose *in vitro* culture has already been developed [13].



ATELIERS DE CONSTRUCTION  
DE **HERSTAL**  
société anonyme



**POMPES INDUSTRIELLES  
ET HYDROCYCLONES**  
pour LIQUIDES CHARGES et ABRASIFS

Nombreuses références dans :

- les huileries de palme
- le transport hydraulique des minerais
- les lavoirs à charbon
- les cimenteries

RUE HAYENEUX 148  
B - 4400 — HERSTAL  
(BELGIQUE)  
Tél. (041) 64 08 40 (3 l.)  
Télex : 42107 « erstal b »

