

Biotechnologies/*Biotechnologies*
(Physiologie végétale/*Plant Physiology*)

Effets du milieu de culture sur la production d'embryoïdes destinés à la cryoconservation chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Florent ENGELMANN et Jean DEREUDDRE

Résumé — Seuls de jeunes embryons somatiques d'un type particulier sont susceptibles de résister à une congélation dans l'azote liquide. Ces embryons, souvent groupés en massifs, sont peu nombreux dans les cultures sur le milieu standard de multiplication. Leur nombre est accru considérablement par une culture sur un milieu enrichi en saccharose (0,3 M). Les résultats diffèrent sensiblement selon les clones étudiés.

Effects of culture medium on the production of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos used for cryopreservation

Abstract — Only young embryoids of a particular type are able to withstand freezing in liquid nitrogen. These embryoids, which are frequently arranged in clumps, are rare when a standard culture medium is used. Their number rises considerably when the sucrose concentration of the culture medium is increased to 0.3 M. Results vary appreciably depending on the clone studied.

Abridged English Version — The method of cryopreservation developed for oil palm somatic embryoids [1] uses pearl white embryoids which generally form small clumps. These structures, which are the only ones likely to withstand freezing in liquid nitrogen, are infrequently observed when the standard proliferation medium is used. The clumps comprise 5 to 10 young embryos and measure about 3 to 5 mm.

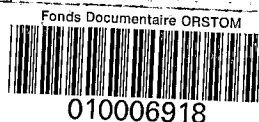
Two clones were used in this study: BC068 from a young greenhouse plant and clone BC156 from a selected adult tree. These two clones were established by somatic embryogenesis induced on primary callus obtained from young leaves. Multiplication was sustained by monthly subcultures of somatic embryos on a standard culture medium devoid of auxin [2], [3].

Various culture media were tested with these two clones, in order to increase the number of structures able to survive deep-freezing in liquid nitrogen (Table). With media supplemented with sucrose (0.1 to 0.75 M), the best results were obtained after two-month culture on medium containing 0.3 M sucrose (instead of 0.1 M sucrose in the standard medium): mean values of 2.35 and 1.98 clumps per tube were noted for clone BC068 and clone BC156 respectively compared with about 0.5 clumps per tube for both clones grown using the standard medium. Smaller increases in the number of embryoid clumps (0.93 for clone BC068 and 1.57 for clone BC156) were noted when Murashige and Skoog medium macroelements were replaced by Heller medium macroelements [4].

Differences between the two clones were also observed when comparing embryoid clump growth (Fig. 1 A and B), which was more rapid in the case of clone BC156. With a medium containing 0.1 M sucrose, clump growth was found to stabilize or decrease after 6 weeks of culture, due to the development of the embryoids and their differentiation into plantlets. On the other hand, using a medium containing 0.3 M sucrose, the number of clumps increased

Note présentée par Alexis MOYSE.

0249-6313/88/03060515 \$ 2.00 © Académie des Sciences



Fonds Documentaire ORSTOM
Cote : B* 6918 Ex : 2

progressively during the two months of culture and reached values of 3.4 clumps per test tube for clone BC068 and 1.8 for clone BC156.

Complementary experiments were performed with clone BC156. Partial replacement of sucrose with 0.2M mannitol (Fig. 1 B) did not lead to an increase in the number of embryoid clumps able to survive freezing in liquid nitrogen. The value obtained after two-month culture (0.5 clump per tube) was similar to that noted for standard medium.

The changes in the number of embryoid clumps could be related to differences in growth patterns between the two clones, in particular concerning the production of plantlets (Fig. 2 A and B). After two-month culture on a medium containing 0.3M sucrose, the number of plantlets obtained with clone BC156 (4.6 per tube) was greater than that noted for clone BC068 (2.2 per tube). The same differences between the two clones were observed whatever the sucrose concentration in the medium.

Longer culture periods (3 to 4 months) with clone BC068 did not lead to increases in the number of clumps of young somatic embryos (3.8 clumps per tube). However, for culture periods of 3 or 4 months, the number of plantlets obtained with clone BC068 equalled that noted after two months with clone BC156 (3.1 and 5.2 after 3 and 4 months of culture respectively). This was due to the fact that the proliferation of clone BC068 is greater than that of clone BC156[5], which delays the development of embryoids into plantlets.

In conclusion, the number of embryoid clumps likely to withstand freezing in liquid nitrogen was increased during two-month culture on a medium containing 0.3M instead of 0.1M sucrose. However, the effect of sucrose was strongly dependent on the clone: clone BC068, which grew faster than clone BC156 on the standard culture medium, showed greater ability to produce clumps of somatic embryos at the juvenile stage which are suitable for cryopreservation. This fact was closely connected with greater somatic embryogenesis in clone BC068 than in clone BC156. Somatic embryogenesis and production of plantlets did not occur simultaneously. Somatic embryogenesis was initially preponderant, and was then followed by plantlet differentiation. This result seemed to be due to a specific effect of sucrose, since its partial replacement by mannitol did not lead to an increase in the number of embryoid clumps in the culture. Similar effects of sucrose and mannitol were observed with haploid embryogenesis: the number of embryos obtained with anthers of *Solanum tuberosum* decreased when sucrose was partially replaced by mannitol[6]. Decrease of water potential was not sufficient to increase the production of adventive somatic embryos at the juvenile stage.

This method, which allows the selection of structures likely to withstand freezing in liquid nitrogen, could be used for cryopreservation of embryoid cultures of other species.

INTRODUCTION. — La méthode de cryoconservation des embryons somatiques mise au point [1] pour le palmier à huile ne concerne que de très jeunes embryoides de couleur blanc brillant, généralement groupés en massifs de 5 à 10 embryons. Les cultures sur le milieu de multiplication standard ne contiennent que très peu d'embryoïdes de ce type. Des méthodes ont donc été recherchées pour obtenir, en plus grand nombre, des embryoides susceptibles de résister à la congélation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Deux clones d'embryoïdes d'*Elaeis guineensis* Jacq., fournis par le Laboratoire O.R.S.T.O.M.-I.R.H.O. de Bondy ont été utilisés pour cette étude : le clone BC068 provenant d'un jeune plant de pépinière et le clone BC156 issu d'un

TABLEAU

Effets de la composition du milieu sur le nombre de massifs utilisables pour la cryoconservation produit par tube après une culture de 2 mois. Les milieux utilisés sont : le milieu minéral standard additionné de 0,1 à 0,75 M de saccharose ou un milieu contenant les macroéléments de Heller (0,1 MH) additionné de 0,1 M de saccharose. Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre de tubes utilisés pour cette détermination.

Changes in the number of embryoid clumps likely to withstand freezing in liquid nitrogen produced per tube after two-month culture on various media. The media used in this experiment were: the standard culture medium supplemented with sucrose (0.1 to 0.75 M) or a medium containing Heller's macroelements and 0.1 M sucrose (0.1 MH). Values in brackets indicate the number of tubes examined in each experiment.

Milieu d'obtention des embryoïdes		0,1 M	0,1 MH	0,2 M	0,3 M	0,4 M	0,5 M	0,75 M
Nombre moyen de massifs par tube Clone	BC 068	0,45 (120)	0,93 (192)	0,66 (48)	2,35 (288)	1,65 (144)	0,68 (168)	0,03 (24)
	BC 156	0,56 (48)	1,57 (240)		1,98 (264)	1,28 (168)	0,67 (168)	

arbre adulte sélectionné. Leur multiplication est assurée par embryogenèse adventive indéfinie à partir d'embryons somatiques apparus sur calcs foliaires [2].

Pour tenter d'accroître le nombre d'embryoïdes susceptibles de résister à l'azote liquide, la composition du milieu standard de multiplication [3] a été modifiée par l'augmentation de la teneur en saccharose (0,1 à 0,75 M), l'addition de mannitol (0,2 M) ou le changement de la composition en sels minéraux, la solution des macroéléments de Murashige et Skoog modifiée [3] étant remplacée par celle de Heller [4].

RÉSULTATS. — Après 2 mois de culture, le nombre moyen de massifs d'embryoïdes utilisables en cryoconservation diffère selon les conditions expérimentales (tableau).

En comparant les 7 conditions expérimentales de cette étude, il est possible d'établir un classement des différents milieux utilisés pour la production de jeunes embryoïdes. Les meilleurs résultats sont obtenus avec 0,3 M de saccharose : 2,35 par tube en moyenne pour le clone BC 068 et 1,98 pour le clone BC 156. Pour le milieu standard (0,1 M de saccharose), les valeurs obtenues sont voisines de 0,5 pour les deux clones. Le milieu de Heller permet également un accroissement du nombre de massifs utilisables en cryoconservation : 0,93 avec le clone BC 068 et 1,57 avec le clone BC 156.

Des différences existent aussi entre les deux clones lorsque l'on considère la dynamique de formation des massifs d'embryoïdes (fig. 1 A et B). Ces massifs apparaissent plus précocement pour le clone BC 156 qui présente une croissance plus lente que pour le clone BC 068. Avec 0,1 M de saccharose, le nombre de massifs d'embryoïdes tend à se stabiliser ou à diminuer selon le clone après 6 semaines de culture, en raison du développement des jeunes embryoïdes. Sur 0,3 M de saccharose au contraire, le nombre de massifs utilisables pour la cryoconservation augmente de façon continue pour atteindre dans cette expérience et après 2 mois de culture, 3,4 en moyenne par tube pour le clone BC 068 et 1,8 pour le clone BC 156.

Cette évolution du nombre de massifs d'embryoïdes peut être mise en rapport avec le comportement différent des deux clones étudiés, notamment par la production de pousses feuillées (fig. 2 A et B). Les premières pousses apparaissent dès la deuxième semaine chez le clone BC 156, au bout de 1 mois seulement pour le clone BC 068 dont la prolifération est plus intense. A la fin de la culture, le nombre moyen de pousses feuillées produit par tube est alors de 1 (BC 068) et de 4 (BC 156). L'utilisation de 0,3 M de saccharose accroît de façon inégale la production de pousses feuillées : elle est multipliée par 2,2 chez le

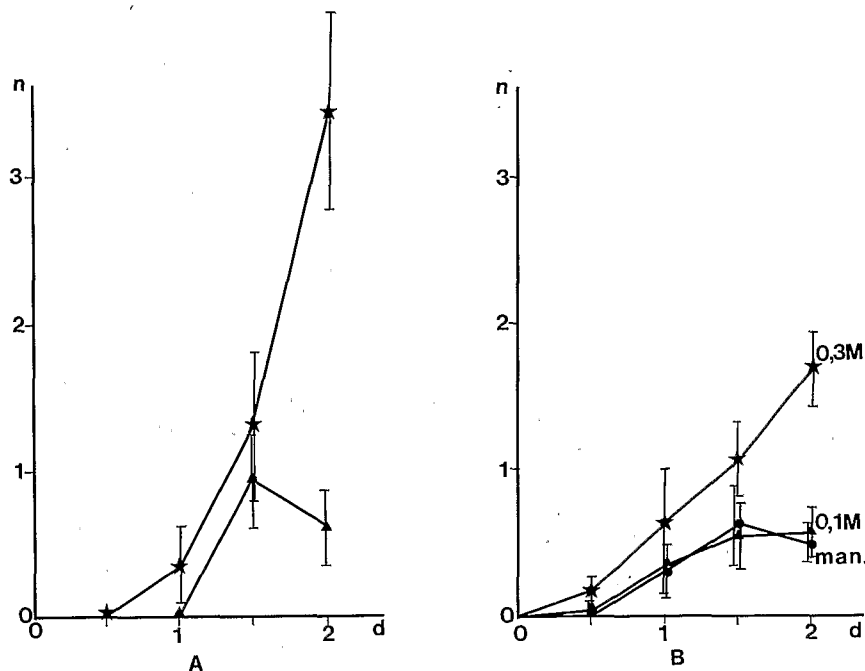


Fig. 1. — Évolution du nombre (n) par tube de massifs d'embryoïdes utilisables en cryoconservation des clones BC068 (A) et BC156 (B) en fonction de la durée (d) de culture (en mois) sur des milieux contenant 0,1 M (▲), 0,3 M (★) de saccharose ou 0,1 M de saccharose et 0,2 M de mannitol (● man.). 48 tubes ont été utilisés par condition. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance au seuil de 95%.

Fig. 1. — Changes in the number (n) per tube of embryoid clumps likely to survive freezing in liquid nitrogen for clones BC068 (A) and BC156 (B), as a function of the culture duration (d , in months) on media containing 0.1 M (▲), 0.3 M (★) sucrose or 0.1 M sucrose and 0.2 M mannitol (● man.). 48 tubes were used for each set of conditions. Vertical bars indicate confidence intervals ($P=95\%$).

clone BC068 et par 1,2 seulement pour le clone BC156. Cependant, les pousses feuillées obtenues sur milieu 0,3 M sont généralement mal développées : elles sont plus compactes, plus petites, avec des feuilles plus larges que celles observées sur milieu de multiplication.

Des expériences complémentaires ont été réalisées avec le clone BC156 (fig. 1 B), l'augmentation de l'osmolarité du milieu de culture étant assurée par du mannitol. Ce polyol, non métabolisable par les cellules n'accroît pas le nombre de massifs utilisables en cryoconservation : la valeur obtenue (0,5 massif par tube en moyenne) étant voisine de celle observée avec le milieu standard.

Des durées plus longues de culture (3 et 4 mois) ont été réalisées afin de déterminer les effets d'un traitement prolongé sur le milieu 0,3 M de saccharose. Avec le clone BC068 qui a été choisi pour ces essais, le nombre moyen de massifs d'embryoïdes demeure sensiblement constant (3,8 massifs par tube après 4 mois de culture), alors que le nombre de pousses feuillées croît régulièrement pour atteindre 3,1 puis 5,2 par tube après 3 puis 4 mois. De plus, la majorité des cultures présentent alors des nécroses et des brunissements importants, ce qui rend les massifs de jeunes embryoïdes inutilisables pour la cryoconservation.

CONCLUSION. — L'augmentation de la teneur en saccharose jusqu'à 0,3 M dans le milieu de multiplication des embryoïdes permet d'obtenir en grand nombre des massifs utilisables en cryoconservation.

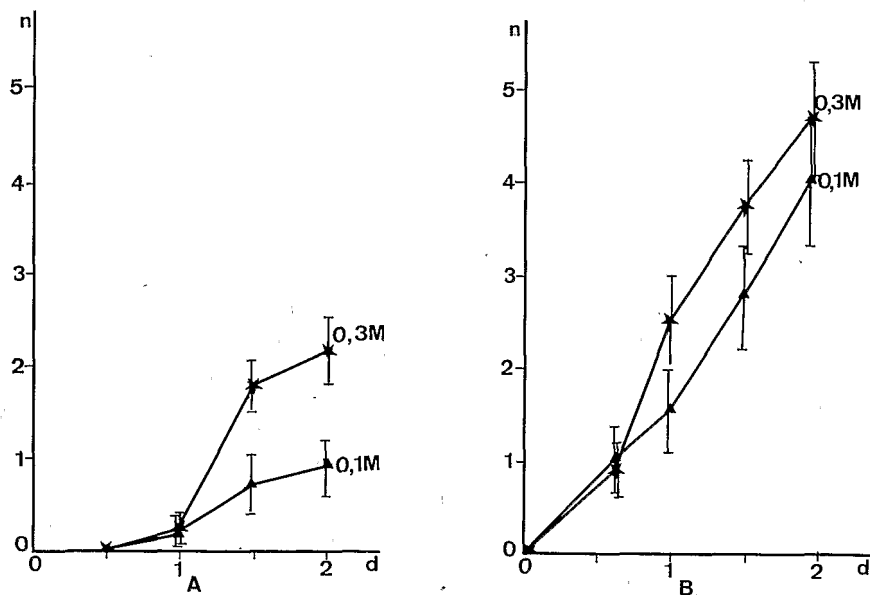


Fig. 2. — Evolution du nombre (n) de pousses feuillées par tube des clones BC 068 (A) et BC 156 (B) en fonction de la durée (d) de culture (en mois) sur des milieux contenant 0,1 M (▲) ou 0,3 M (★) de saccharose. 48 tubes ont été utilisés par condition. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance au seuil de 95%.

Fig. 2. — Changes in the number (n) of shoots produced per tube for clones BC 068 (A) and BC 156 (B), as a function of the culture duration (d , in months) on media containing 0.1 M (▲) or 0.3 M (★) sucrose. 48 tubes were used for each set of conditions. Vertical bars indicate confidence intervals ($P=95\%$).

Cependant, les résultats varient selon le clone. Ils reflètent les différences de comportement qui existent entre le clone BC 068 et le clone BC 156. Le clone BC 068 présente une croissance pondérale plus importante que le clone BC 156 [5], ce qui traduit une embryogenèse adventive plus intense qui retarde l'apparition des pousses feuillées. Ces deux phénomènes, prolifération et production de pousses feuillées, sont en effet décalés dans le temps, l'apparition des pousses feuillées faisant suite à la prolifération [5]. Dans le cas du clone BC 156, la prolifération est plus faible que pour le clone BC 068 et la production de pousses feuillées devient rapidement prédominante. L'augmentation de la durée de culture réalisée avec le clone BC 068 confirme cette observation : après 4 mois de culture, le nombre de pousses feuillées par tube est le même que celui obtenu en 2 mois avec le clone BC 156.

L'expérimentation complémentaire réalisée sur le clone BC 156 (remplacement d'une partie du saccharose par du mannitol) montre que l'augmentation du nombre d'embryoïdes sur le milieu d'obtention est due à un effet spécifique du saccharose. Elle ne résulte pas de la seule élévation de la pression osmotique : à pressions osmotiques égales, seul le saccharose semble augmenter le nombre d'embryoïdes du type recherché. Un phénomène analogue a été observé lors de la culture d'anthères de *Solanum tuberosum* [6] : si une partie du saccharose est remplacée par du mannitol, la production d'embryons polliniques diminue. Le saccharose n'a donc pas, dans ces deux cas, qu'un simple effet osmorégulateur. Cette méthode, qui permet la sélection de structures capables de résister à la congélation dans l'azote liquide, pourrait être étendue à des cultures d'embryons somatiques d'autres espèces.

Note reçue le 22 février 1988, acceptée le 11 mars 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] F. ENGELMANN, Y. DUVAL et J. DEREUDDRE, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 301, série III, 1985, p. 111-116.
[2] C. PANNETIER, P. ARTHUIS et D. LIEVOUX, *Oléagineux*, 1981, 36, p. 119-122.
[3] J. HANOWER et C. PANNETIER, *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell culture*, Tokyo, 1982, p. 745-746.
[4] R. HELLER, *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.*, 14, 1953, p. 1-223.
[5] F. ENGELMANN, *Thèse Doct. Univers.*, Paris-VI, 1986, 228 p.
[6] S. K. SOPORY, *Can. J. Bot.*, 57, 1979, p. 2691-2694.

F. E. et J. D. : *Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux après Récolte*, C.N.R.S.,
4 ter, route des Gardes, 92190 Meudon;

F. E. : I.R.H.O., Département Oléagineux du C.I.R.A.D.,
Centre de Coopération internationale en Recherche agronomique pour le Développement,
11, square Pétrarque, 75116 Paris;

J. D. : *Laboratoire de Cryobiologie végétale*,
Université Pierre-et-Marie-Curie, 12, rue Cuvier, 75230 Paris Cedex 05.