

EFFETS DU MODE DE CONGELATION SUR LA SURVIE ET LA REPRISE DE LA PROLIFERATION
D'EMBRYONS SOMATIQUES DE PALMIER A HUILE (ELAEIS GUINEENSIS JACQ.)
APRES LEUR CONSERVATION DANS L'AZOTE LIQUIDE.

F. ENGELMANN

Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte,
CNRS, 4 ter route des Gardes, 92190 Meudon, France

1. SUMMARY. The rapid freezing rate ($200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) used initially for the cryopreservation of oil palm somatic embryos ensures recovery rates of 8 and 15% respectively for the 2 clones studied. A two-stage freezing method, which comprises a controlled freezing (0.5 to $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) from $+20^{\circ}\text{C}$ to -100°C , followed by the immersion of the samples in liquid nitrogen, ensures similar results with freezing rates faster than $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The large extent of the usable freezing rates should allow the determination of a suitable rate for every clone. Lastly, the use of a programmable freezer is not obligatory for the cryopreservation of such a material.

2. INTRODUCTION. La technique de multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile utilise l'embryogenèse somatique à partir de calcs foliaires (12). Ce procédé est maintenant employé pour la production industrielle de vitro-plants (11). L'entretien de cultures en conditions artificielles pendant plusieurs années présente des risques pour la stabilité génétique du matériel, risques qui augmentent avec la durée de culture *in vitro* et la présence de régulateurs exogènes dans le milieu (2). Ceci peut conduire à une perte de la conformité des vitro-plants par rapport à l'individu de départ. Cette possibilité a été illustrée récemment, dans le cas du palmier à huile, par des chercheurs anglais (4) : 95% des arbres produits à partir de matériel clonal cultivé *in vitro* pendant 3 ans présentent des anomalies graves de développement.

La seule méthode susceptible d'assurer à la fois le maintien des caractéristiques des cultures, leur stockage dans un faible volume à l'abri des contaminations et un entretien réduit, est la cryoconservation, c'est-à-dire la conservation à très basse température, généralement celle de l'azote liquide (-196°C). A cette température, en effet, les divisions cellulaires sont bloquées et tous les processus métaboliques sont arrêtés (9). Le matériel végétal peut être ainsi conservé sans altérations ni modifications pendant une durée théoriquement indéfinie. La technique de cryoconservation mise au point pour les embryons somatiques de palmier à huile utilise un refroidissement rapide (6). Elle permet d'obtenir régulièrement une reprise de l'embryogenèse adventive et des vitro-plants dont le développement en pépinière est normal jusqu'à présent (5).

Dans cet article, l'effet de refroidissements plus lents ($0,5$ à $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) est comparé aux résultats obtenus avec la technique de congélation rapide ($200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) initialement employée (6).

3. MATERIEL ET METHODES. Deux clones d'embryoïdes ont été utilisés : le clone BC 068, provenant d'un jeune plant de pépinière et le clone BC 156, obtenu à partir d'un arbre adulte.

Les embryoïdes sont cultivés sur un milieu de Murashige et Skoog modifié (8) contenant $0,1\text{M}$ de saccharose et dépourvu de régulateurs de croissance (6). Des essais préliminaires ont montré qu'une culture de 2 mois sur le milieu standard contenant $0,3\text{M}$ de saccharose permet d'obtenir avec une fréquence élevée de jeunes embryons non chlorophylliens, d'une taille de 1 à 3 mm qui sont seuls capables de supporter la congélation. Ces jeunes embryons sont ensuite isolés par massifs et subissent le traitement suivant :

- Prétraitement : Les massifs d'embryons sont placés dans des boîtes de Petri pendant 7 jours, sur un milieu gélosé (8 g/l) contenant $0,75\text{M}$ de saccharose.

- Congélation : les massifs d'embryons sont introduits à sec dans des ampoules stériles de 2 ml en polypropylène.

. Refroidissement rapide ($200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) : les ampoules cryobiologiques sont immergées directement dans l'azote liquide.

. Refroidissement en deux étapes : refroidissement contrôlé de $+20^{\circ}\text{C}$ à -100°C réalisé à l'aide d'un congélateur programmable de type " Minicool ", suivi d'une immersion des ampoules dans l'azote liquide. Les vitesses de congélation utilisées sont de 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 et $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

- Réchauffement : les échantillons sont décongelés en plongeant les ampoules dans un bain marie à 40°C pendant 1 min.

- Post-traitement : les massifs d'embryoïdes sont cultivés pendant 3 semaines en boîtes de Petri sur un milieu contenant 10^{-6}M de 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), avant leur repiquage en tubes sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance.

4. RESULTATS. Les résultats concernant les taux de survie et de reprise des massifs d'embryoïdes après leur congélation sont représentés sur la Fig. 1. Le taux de survie, déterminé 3 semaines après la congélation, correspond au pourcentage de massifs ayant présenté une croissance pendant le post-traitement. Le taux de reprise, mesuré 11 semaines après la décongélation, correspond au pourcentage de massifs congelés ayant présenté une reprise de l'embryogenèse adventive.

Le taux de survie des embryoïdes du clone BC 068 après une congélation à -196°C varie de 58% à 80%, quelle que soit la vitesse de refroidissement. Avec le clone BC 156, au contraire, les écarts sont plus marqués entre les taux de survie obtenus pour les refroidissements lents (48% pour $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ et 46% pour $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) et les refroidissements les plus rapides (10 à $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) qui assurent des taux de survie variant de 75 à 79%. Les différences observées entre ces deux groupes de résultats, refroidissements lents et refroidissements plus rapides, sont significatives (test χ^2 , $p = 0,05$). Pour une vitesse de refroidissement donnée, la comparaison entre clones des taux de survie obtenus ne fait apparaître aucune différence significative (test χ^2) que le refroidissement soit lent ou rapide.

Pour le clone BC 068, une reprise de la prolifération est obtenue dans tous les cas. Elle varie de 9,3% après une congélation de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ à 22,9% pour une descente en température de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les différences observées ne sont pas significatives (test χ^2 , $p = 0,05$). Dans le cas du clone BC 156, aucune reprise de l'embryogenèse n'est obtenue lorsque les massifs d'embryoïdes sont congelés à la vitesse de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; le pourcentage de reprise est faible pour un refroidissement de $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (2,1%); il augmente ensuite pour se stabiliser à 8,33% pour des vitesses de congélation de 20 ; 40 et $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les résultats obtenus avec les refroidissements les plus rapides, 20 ; 40 et $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ sont significativement différents du taux de reprise observé avec la vitesse de congélation la plus lente, soit $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

La comparaison des taux de reprise obtenus au cours de cette expérimentation fait ressortir des différences importantes entre les deux clones, BC 068 et BC 156 (15% pour le premier clone en moyenne, toutes conditions confondues et 6% en moyenne pour le second). Cette différence de comportement en faveur du clone BC 068 se manifeste quelle que soit la vitesse de refroidissement. Les courbes représentant les variations des taux de survie et de reprise de chaque clone ont des tracés parallèles : la différence entre les taux de survie et de reprise reste pratiquement constante quelle que soit la vitesse de refroidissement ; elle est d'environ 55% pour le clone BC 068 et de 62% pour le clone BC 156. Les taux de reprise du clone BC 156 apparaissent ainsi inférieurs à ceux obtenus avec le clone BC 068.

Pour certaines vitesses de congélation, les expérimentations ont été renouvelées plusieurs fois, afin de juger de la reproductibilité des résultats. Les taux de reprise obtenus avec les deux clones au cours de ces différentes

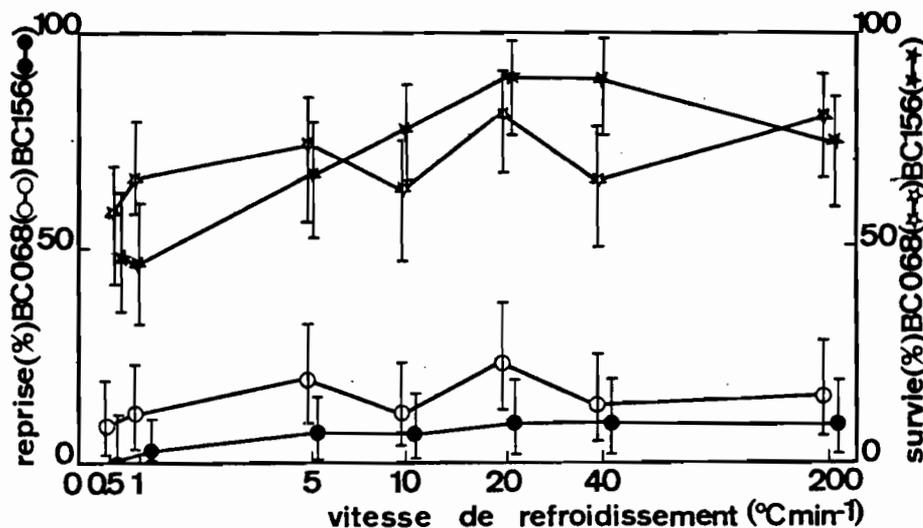


Fig. 1 : Effets de la vitesse de refroidissement ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) sur la survie (\star, \star) et la reprise de la prolifération (\circ, \bullet) de massifs d'embryoïdes des clones BC 068 (\star, \circ) et BC 156 (\star, \bullet). 43 à 48 massifs d'embryoïdes ont été utilisés par condition. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance des pourcentages de survie et de reprise.

expériences sont indiqués dans le Tabl.1. Avec des vitesses de refroidissement faibles ($0,5$ et $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) les taux de reprise sont inférieurs à ceux obtenus avec des vitesses de congélation égales ou supérieures à $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, aussi bien pour le clone BC 068 que pour le clone BC 156. Le clone BC 156 semble plus sensible à la congélation que le clone BC 068 qui présente des pourcentages de reprise supérieurs dans toutes les conditions expérimentales. Le taux de reprise de la prolifération des massifs d'embryoïdes des deux clones semble donc dépendre de la vitesse de congélation.

	Vitesse de refroidissement ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)						
	0,5	1	5	10	20	40	200
CLONE BC068							
Taux de re-	7,8	7,8	20,3	12,2	23,8	15,2	18,2
prise moyen							
(X)	(2-18)	(2-18)	(10-34)	(7,5-22)	(14-26)	(7-26)	(10-28)
CLONE BC156							
Taux de re-	1,2	2,1	7,6	6,3	8,3	8,6	8,1
prise moyen							
(X)	(0-4)	(0-10)	(2-17)	(1-16)	(2-20)	(3-18)	(3-15)

Tabl. 1 : Pourcentages moyens de reprise de la prolifération d'embryoïdes des clones BC 068 et BC 156 après congélation en fonction de la vitesse de refroidissement. Le taux de reprise moyen pour chaque vitesse de congélation est indiqué avec son intervalle de confiance entre parenthèses.

5. DISCUSSION. Les taux de survie obtenus avec les embryoides des deux clones étudiés sont relativement élevés quelle que soit la vitesse de congélation, puisqu'ils varient de 58 à 81% pour le clone BC 068 et de 46 à 79% pour le clone BC 156. Entre la mesure de la survie, 3 semaines après la décongélation, et celle de la reprise de la prolifération des massifs, 11 semaines après le réchauffement, un certain nombre de massifs considérés comme vivants à la fin du post-traitement se nécrosent, dans des proportions à peu près équivalentes pour toutes les vitesses de refroidissement. SEIBERT et WETHERBEE (13) observent le même phénomène après la congélation de méristèmes d'oeillets : 35 à 40% des méristèmes congelés ne se développent pas pour donner des plantules, quelle que soit la vitesse à laquelle ils ont été refroidis. Il est probable que les massifs d'embryoïdes dont l'évolution reste limitée ne présentent plus assez de tissus méristématiques vivants pour assurer une reprise ultérieure de la prolifération. Ce phénomène est particulièrement net pour des congélations lentes : la reprise de la prolifération, lorsqu'elle a lieu, se produit seulement à partir de zones localisées des massifs congelés. La différence de résistance à l'azote liquide qui existe entre les deux clones étudiés est à rapprocher des observations similaires faites dans le cas d'apex de pomme de terre (14), ou d'oeillet (7). Les meilleurs résultats obtenus avec le clone BC 068 pourraient être dûs à la reprise plus rapide de la multiplication des cellules et des processus de restauration des fonctions cellulaires transitoirement altérées par la congélation, comme le transport actif lié au plasmalemma (3).

Le résultat le plus original concernant les embryoïdes de palmier à huile est la possibilité d'obtenir une reprise de leur prolifération après des congélations à des vitesses très différentes, de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ à $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à -100°C avant immersion dans l'azote liquide ou d'environ $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ lors d'une congélation directe à -196°C . Les taux de reprise sont cependant plus faibles pour des refroidissements lents ($0,5$ et $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) que pour des refroidissements plus rapides. En effet il existe pour tout matériel une gamme assez réduite de vitesses de congélation permettant d'obtenir des taux de survie élevés. Ainsi, dans le cas de méristèmes de fraisier, l'optimum se situe à $0,84^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ avec une survie de 95% ; elle chute à 33% si la vitesse de congélation passe à $0,95^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (10). En ce qui concerne les embryons, seule une congélation rapide a permis jusqu'à présent la survie d'embryons zygotiques de maïs (15) ou de blé (1). Au contraire, des embryons somatiques de carotte ne survivent qu'à des refroidissements lents ou intermédiaires (16).

Sur le plan pratique, la répétition de certaines expériences de congélation a conduit à l'obtention de taux de reprise voisins, ce qui permet de conclure à une bonne reproductibilité des résultats. D'autre part, l'étendue importante des vitesses de congélation utilisables doit permettre de trouver un régime de refroidissement adapté à chaque clone. Enfin, si l'utilisation d'un congélateur programmable permet seule d'obtenir des vitesses de refroidissement précises et parfaitement reproductibles, la congélation des massifs d'embryoïdes par immersion directe des ampoules cryobiologiques dans l'azote liquide a donné de bons résultats avec les clones étudiés. Le stockage de clones d'embryoïdes de palmier à huile est donc également réalisable sans appareillage sophistiqué.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- (1) BAJAJ, Y.P.S. Freeze-preservation of plant cells - a novel approach to the conservation of germplasm. In : GUPTA : Genetics and wheat improvement. New Delhi : Oxford and IBH 1980.
- (2) BAYLISS, M.W. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. Int. Rev. Cytol., Suppl. 11A : 113-144.
- (3) CELLA, R., COLOMBO, R., GALLI, M.G., NIELSEN, E., ROLLO, F. et SALA, F. 1982. Freeze-preservation of rice cells : a physiological study of freeze-thawed cells. Physiol. Plant. 55 : 279-284.

- (4) CORLEY, R.H.V., LEE, C.H., LAW, I.H. et WONG, C.Y. 1986. Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter*. 62 : 233-240.
- (5) ENGELMANN, F. et DUVAL, Y. 1986. Cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) : résultats et perspectives d'application. *Oléagineux*. 41 : 169-174.
- (6) 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, ser. III : 111-116.
- (7) GALERNE, M. 1985. Effets du saccharose sur la résistance à la congélation dans l'azote liquide (-196°C) des méristèmes d'oeillets (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivés *in vitro*. Mémoire de D.E.A., Université P. et M. Curie, Paris VI.
- (8) HANOVER, J. et PANNETIER, C. *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. In : FUJIWARA : Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Tokyo : IAPTC 1978.
- (9) KARTHA, K.K. Genepool conservation through tissue culture. RAO : Proc. COSTED Symp. On Tissue Culture of Economically Important Plants. Singapore 1981.
- (10) KARTHA, K.K., LEUNG, N.L. et PAHL, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105 : 481-484.
- (11) NOIRET, J.M., GASCON, J.P. et PANNETIER, C. 1985. La production de palmier à huile par culture *in vitro*. *Oléagineux*. 40 : 365-372.
- (12) PANNETIER, C., ARTHUIS, P. et LIEVOUX, D. 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.
- (13) SEIBERT, M. et WETHERBEE, P.J. 1977. Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. *Plant Physiol.* 59 : 1043-1046.
- (14) TOWILL, L.E. 1984. Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups *Andigena*, *Sterrotomum*, *Tuberosum*, and other tuber-bearing *Solanum* species. *Cryo-letters*. 5 : 319-326.
- (15) WITHERS, L.A. Freeze-preservation of cultured cells and tissues. In : THORPE : *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Calgary : IAPTC 1978.
- (16) WITHERS, L.A. 1979. Freeze-preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota*). *Plant Physiol.* 63 : 460-467.

Wien '87



XVIIth INTERNATIONAL
CONGRESS OF
REFRIGERATION

XVIIe CONGRÈS
INTERNATIONAL
DU FROID

XVII. INTERNATIONALER
KONGRESS FÜR
KÄLTETECHNIK

C

Engelmann Florent (1987)

Effets du mode de congélation sur la survie et la reprise de la prolifération d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) après leur conservation dans l'azote liquide)

In : International Congress of Refrigeration : proceedings =
Congrès International du Froid = Internationaler Kongress für
Kältetechnik

Paris : International Institute of Refrigeration, 49-53

International Congress of Refrigeration = Congrès
International du Froid = Internationaler Kongress für
Kältetechnik , 17., Vienne (AUT), 1987/08/24-29