Pole 5
ORSTOM Fonds Documentaire
M N° : 25104 ex1
75 Cote : B
Date : 880706

L'embryogenèse somatique en milieu liquide du palmier à huile : *Elaeis guineensis* Jacq. et *E. guineensis* × *E. melanococca*. Premiers résultats

B. MALAURIE (1)

Résumé. — Des structures de type embryoïdes ont été obtenues en milieu liquide à partir de cultures à croissance rapide (CCR) et de cals primaires appartenant à plusieurs clones de palmier à huile (*E. guineensis* et d'hybrides interspécifiques). Seuls des embryoïdes obtenus à partir de cals primaires ont poursuivi leur développement jusqu'au stade plantule. Des structures polarisées de type embryoïdes sont apparues après le transfert des cultures en milieu liquide (96 jours pour l'hybride interspécifique, 51 pour *E. guineensis*). L'une d'entre elles, issue de cal primaire de l'hybride interspécifique s'est développée ultérieurement en pousse feuillée. Ce caractère d'embryoïde des formations obtenues a été confirmé par des examens histologiques. Ceux-ci ont permis par ailleurs de mettre en évidence un phénomène d'embryogenèse secondaire ou adventive à partir des tissus du limbe cotylédonaire de l'embryoïde.

INTRODUCTION

La régénération d'une plante entière par embryogenèse somatique à partir de suspensions cellulaires, a été décrite pour la première fois chez la carotte par Steward *et al.* [1958, 1964]. De nombreux travaux sur d'autres dicotylédones ont abouti à des résultats analogues (*Ranunculus sceleratus* : Konar et Nataraja [1965] ; *Cichorium endivia* : Vasil et Hildebrandt [1966] ; *Atropa belladona* : Konar *et al.* [1972 b] ; *Glycine max* : Kern *et al.* [1986]). Chez les monocotylédones, les résultats sont moins nombreux.

On peut citer : *Asparagus officinalis* [Wilmar et Hellendoorn, 1968 ; Steward et Mapes, 1971], *Bromus inermis* [Constabel *et al.*, 1971], *Pennisetum americanum* [Vasil et Vasil, 1980, 1981], *Panicum maximum* [Lu et Vasil, 1981 b].

Le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) est une monocotylédone arborescente pérenne et allogame, à reproduction strictement sexuée. Il a fait l'objet de nombreux travaux aboutissant à la multiplication végétative *in vitro* par embryogenèse somatique à partir de tissus foliaires [Rabechault et Martin, 1976 ; Ahée *et al.*, 1981 ; Pannetier *et al.*, 1981 ; Hanower et Pannetier, 1982 ; Noiret *et al.*, 1985] ou à partir de tissus de racines [Corley *et al.*, 1977, 1979]. Mais à notre connaissance aucune publication ne fait état de phénomène d'embryogenèse somatique en milieu liquide.

Dans cet article, nous rendons compte des premiers résultats obtenus en ce domaine au laboratoire de physiologie végétale de l'ORSTOM à Bondy (France) en 1980-1981.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal utilisé est constitué de cals primaires et de cals secondaires dénommés « cultures à croissance rapide » [Ahée *et al.*, 1981]. Ils sont issus d'explants foliaires de jeunes plants — 2 ans à partir de la graine germée — (*Elaeis guineensis* et hybrides interspécifiques *E. guineensis* × *E. melanococca*) (Station de La Mé, IRHO-CIRAD-Côte d'Ivoire).

Les cals primaires et secondaires (CCR) provenant du souchier du laboratoire avaient déjà subi plusieurs cycles sur milieux auxiniques. Les cals primaires sont de couleur beige et ont une structure compacte, nodulaire qui ne permet pas de les écraser lors de la mise en milieu liquide.

Les cals à croissance rapide (CCR) provenant du cal primaire ont une structure légère et aérée, quelque peu granuleuse, et une grande friabilité au toucher [Ahée *et al.*, 1981]. Cette structure va permettre de les écraser facilement avant de les mettre en suspension, en milieu liquide dans des erlenmeyers ou des flacons pour « Roller-bottle ». Le volume de milieu de culture est ajusté au cinquième du volume total.

Les essais ont été réalisés sur des tables d'agitation (100 tpm), des Roller-bottle (59 à 166 tpm en fonction du flaconnage) sous un éclairement diffus (0,8 W/m^2 à 2,1 W/m^2 ; 12 h/jour) et à une température comprise entre 25 et 30 °C.

Les milieux de culture renferment les macroéléments de Murashige et Skoog [1962] modifiés [Rabechault et Martin, 1976], les microéléments de Nitsch [Nitsch *et al.*, 1969], du fer sous forme chélatée Fe EDTA (5 mg/l), les vitamines de Morel et Wetmore [1951], de l'hydrolysat de caséine (500 mg/l), de l'ascorbate de sodium (100 mg/l) et du glucose (20 g/l).

Les associations et concentrations des différentes substances de croissance utilisées (acide dichlorophénoxyacétique, 2,4-D ; acide naphtalène acétique, ANA ; 6.benzylaminopurine, BAP ; adénine sulfate) seront précisées dans la suite du texte.

Le pH des milieux est ajusté à 5 avant autoclavage (20 min à 120 °C).

Une étude histologique des structures observées a été réalisée : les embryoïdes ont été fixés dans le Navashine pendant une durée d'environ 48 h. Ils sont ensuite inclus dans du paraplast. La coloration des coupes (11 µm) est faite dans de l'hématoxyline ferrique pendant 15 min. Les coupes sont prêtes pour l'observation après montage entre lames et lamelles avec du baume du Canada.

(1) ORSTOM, Laboratoire de Biotechnologie, B.P. V 51, Abidjan (Côte d'Ivoire).

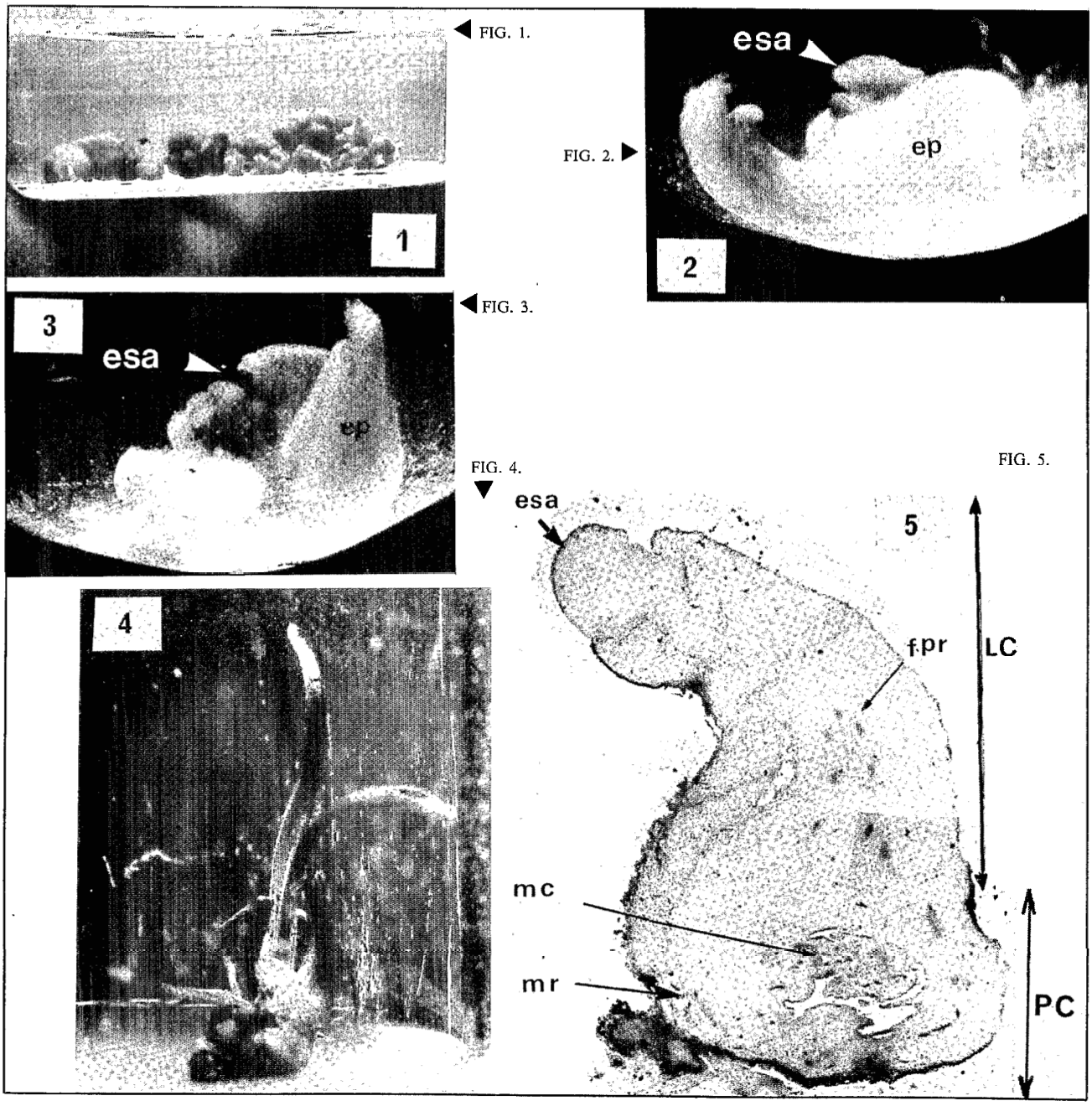

FIG. 1, 2 et 3. — Embryogenèse en milieu liquide à partir de CCR — FIG. 2, 3 : Prolifération d'un embroïde primaire (ep) en embryoïde secondaire ou embryon somatique adventif (esa) (× 1 ; × 5,6 ; × 4,8).

FIG. 4. — Pousse feuillée issue d'un embryoïde obtenu en milieu liquide sur cal primaire (× 3,4).

FIG. 5. — Coupe longitudinale axiale d'un embryon somatique issu de cal primaire. On peut distinguer dans la partie du pétiole cotylédonaire (PC), la gemmule constituée du méristème caulinaire (mc). Sur la partie supérieure, le limbe cotylédonaire (LC) où l'on peut voir les faisceaux du procambium (fpr), et à l'extrémité du LC la formation d'un embryon somatique adventif (esa) (× 22).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. — Embryogenèse directe en milieu liquide à partir de cultures à croissance rapide (CCR).

A partir des CCR provenant de 5 clones issus d'individus *E. guineensis* et maintenus sur un milieu approprié d'entretien des CCR [Ahée *et al.,* 1981], quatre cultures ont manifesté différentes évolutions morphologiques dans les mêmes conditions de culture, donnant en suspension soit des nodules, soit des racines, soit les deux. La cinquième culture n'a présenté aucune évolution. Le nombre de répétitions par clone est de 14 avec la répartition suivante : 2 flacons de 3 000 ml, 4 de 500 ml et 8 de 100 ml. Ces flacons sont disposés sur Roller-bottle.

Partant d'un stade « nodulaire » (agrégats blancs de 1 mm de diamètre environ), 2 cas d'évolution sont observés :

a) **formation d'un réseau de racines minces** enchevêtrées pouvant occuper tout le volume du milieu liquide ; cette évolution est similaire à celle déjà décrite par Halperin [1966] sur une suspension cellulaire de *Daucus carota* et constatée chez les monocotylédones par Vasil et Vasil [1982] ;

b) **les « nodules »** grossissent et **deviennent des « masses globulaires » jaune-vert de 2 à 4 mm de diamètre.**

Les « masses globulaires » ont donné 3 autres cas de figure :

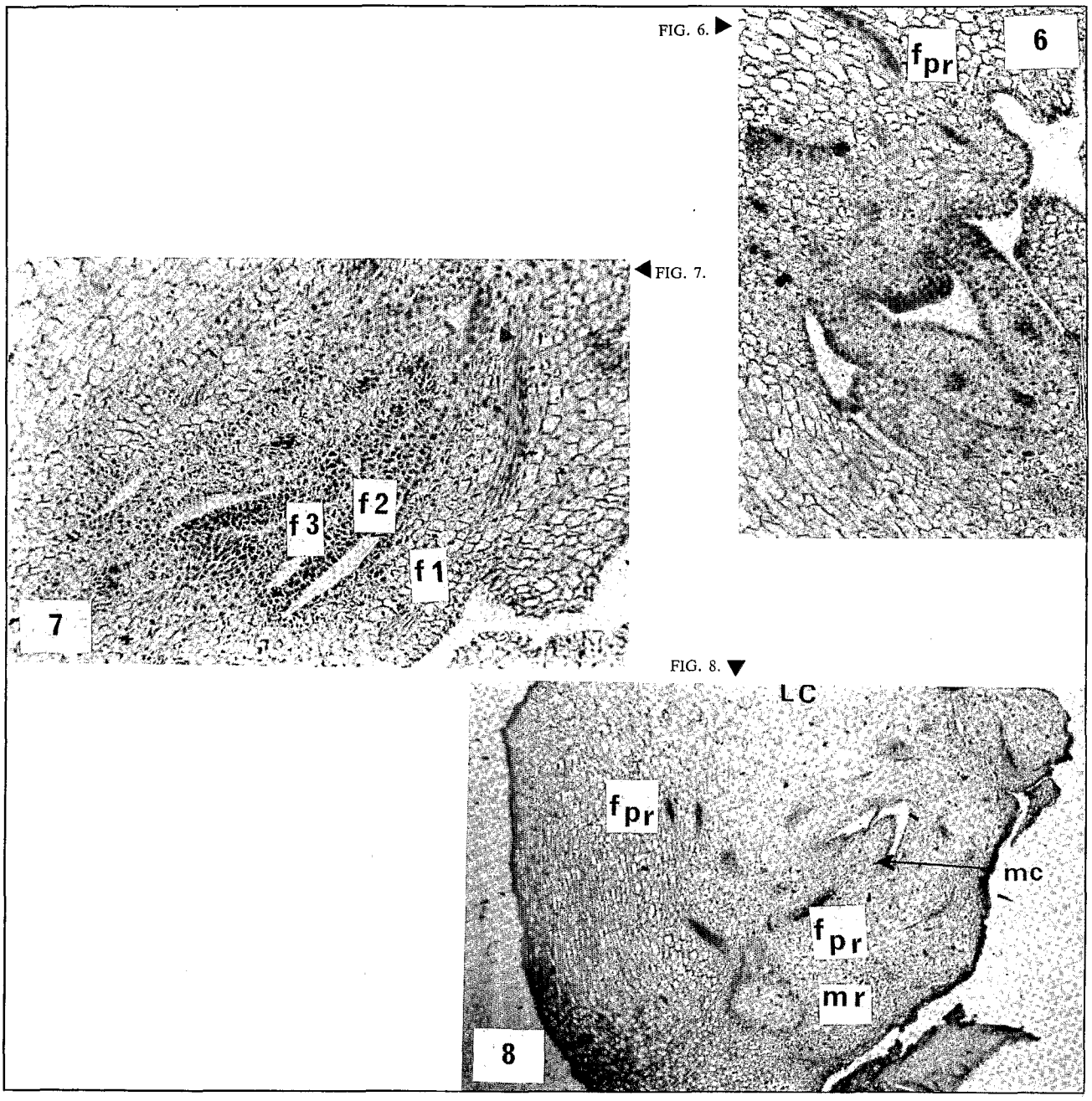

FIG. 6. — Partie gemmulaire de l'embryoïde montrant les 2 feuilles de niveau (f3) bien individualisées, ainsi que les faisceaux procambiaux (fpr) la reliant au méristème racinaire (× 290).
FIG. 7. — Coupe longitudinale de la gemmule, à un autre niveau que la figure 6, montrant les 3 premières feuilles f1, f2, f3 bien individualisees (× 230).
FIG. 8. — Coupe longitudinale de l'embryoïde, à un niveau autre que la figure 5, montrant la vascularisation par des faisceaux du procambium (fpr), entre le méristème racinaire (mr) et le méristème caulinaire (mc) d'une part, et d'autre part avec le limbe cotylédonaire (LC) (× 60).

— évolution en racines,
— brunissement progressif et nécrose,
— évolution vers une structure polarisée de 5 à 6 mm de long, ressemblant aux stades « torpedo » ou « torpille » des dicotylédones. Un blocage dans la poursuite de leur développement a été constaté (Fig. 1).

Les « masses globulaires », provenant d'un clone et indemnes de brunissement ont été récupérées sur un tamis (vide, de mailles 1 000 µm) à 26 jours de culture, et réparties sur 4 traitements faisant varier la concentration des facteurs de croissance ANA et BAP. Les associations suivantes ont été testées : ANA (0, 1, 2 mg/l) + BAP (2 mg/l) ainsi que le témoin sans ANA ni BAP. Quatorze répétitions par variante ont été utilisées avec les différents flaconnages précédemment décrits.

Deux types de résultats ont été obtenus : aucune évolution n'a été constatée pour les traitements ne contenant pas d'ANA. L'addition d'ANA (1 et 2 mg/l) et de BAP (2 mg/l) a favorisé le développement d'un grand nombre de formations de type embryoïde au stade polarisé après 80 jours de culture en milieu liquide.

La poursuite ultérieure de leur développement vers le stade plantule n'a pu être obtenue. Le développement d'embryoïdes secondaires, ou embryoïdes adventifs, au niveau du limbe cotylédonaire, a été constaté (Fig. 2, 3). Ce type de prolifération avait déjà été observé sur les embryoïdes de palmier à huile obtenus sur milieu solide [Ahée *et al.*, 1981 ; Pannetier *et al.*, 1981] ; dernièrement Lupotto [1986] mentionne aussi ce phénomène sur une culture d'embryons somatiques de *Medicago sativa* L. La

presque totalité des formations embryoïdes (89 p. 100 pour ANA 1 mg/l et 95 p. 100 pour ANA 2 mg/l) a été obtenue dans les flacons de 500 ml. Il semble donc que le type de flaconnage ait une importance sensible sur l'évolution des cultures. Il peut s'agir là de la combinaison de deux facteurs : sur le Roller-bottle utilisé, le type de flaconnage est lié à une vitesse de rotation spécifique. Les flacons de 3 000 et 100 ml ont des vitesses respectives de rotation de 59 et 166 tpm. Rajasekhar *et al.* [1971] font état de l'influence de la vitesse de rotation et du type de flaconnage sur l'évolution des cultures ; la vitesse optimale serait, selon eux, de 100 tpm, suivant le volume de culture, assurant la meilleure oxygénation du milieu et des cultures. Dans notre cas, le flaconnage donnant les meilleurs résultats (500 ml) avait une vitesse de rotation de 108 tpm.

La formation de racines constatée sur des CCR en milieu liquide n'est pas observée sur un milieu identique en présence de gélose. Cependant Halperin [1966] a constaté que des amas cellulaires ayant donné des racines en suspension, placés sur un milieu gélosé, présentent un développement caulogène.

2. — Embryogenèse directe en milieu liquide à partir de cals primaires et développement en pousse feuillée.

Le matériel végétal, utilisé à l'état de cals primaires, provient de deux clones différents. L'un est issu d'un hybride interspécifique *E. guineensis* × *E. melanococca,* l'autre provient d'un *E. guineensis.*

Le premier clone a été placé sur différents traitements variant dans la composition du milieu en substances de croissance (ANA : 1 à 2 mg/l ; 2,4-D : 0,5 à 2 mg/l ; BAP : 0,1 à 2 mg/l ; adénine sulfate : 30 à 40 mg/l), en présence ou en l'absence de charbon (200 mg/l). Chaque traitement comprenait une première subculture de 78 jours et une seconde de 18 jours. Sur l'ensemble des traitements, trois seulement ont permis la poursuite du développement des « masses globulaires » jusqu'au stade « structures polarisées » 18 jours après le début de la seconde subculture (Tabl. I). Un des traitements a permis d'obtenir le développement d'une « structure polarisée » jusqu'au stade pousse feuillée (Fig. 3) après transfert de cette structure sur milieu gélosé.

Pour le second clone, des formations embryoïdes ont été obtenues également en modifiant la composition et la concentration des substances de croissance d'une subculture à l'autre : 2,4-D (5 à 100 mg/l) ; BAP (0 à 1 mg/l) ; adénine sulfate (0 à 30 mg/l) (Tabl. I).

TABLEAU I. — **Embryogenèse directe en milieu liquide à partir de cals primaires**

	Hybride interspécifique *E. guineensis* × *E. melanococca*		*E. guineensis*	
	1re subculture 78 j (1)	2e subculture 18 j	1re subculture 21 j (1)	2e subculture 30 j
Nombre de répétitions/variante	10	10	20	20
Nombre moyen d'embryoïdes/répétition	0	5	0	9
Nombre de répétitions avec stade plantule	0	1	0	0

(1) Type de formations observées : masses globulaires.

Le cal primaire, du fait de sa structure compacte, ne peut donner une suspension d'agrégats en milieu liquide. Malgré cet inconvénient, les cals ont été placés dans leur intégralité dans le milieu liquide sans être fragmentés.

Pour les cals primaires, comme pour les CCR, nous observons une action favorable du milieu liquide sur la rapidité d'expression puis de développement des structures organogènes. En effet, pour le second clone, *Elaeis guineensis* Jacq., nous observons la formation d'embryoïdes polarisés après seulement 51 jours de culture des cals primaires en milieu liquide.

Le stade ultime, obtenu en milieu liquide, consistait en un embryoïde avec la sortie de la première feuille. Plusieurs embryoïdes sont arrivés à ce stade ultime mais le blocage de leur évolution nous a conduit à en placer certains sur un milieu gélosé, les autres restant comme témoins en milieu liquide. Un seul embryoïde avec sa première feuille a évolué en pousse feuillée sur milieu gélosé. Des phénomènes classiques de prolifération d'embryons somatiques à partir de certains tissus de l'embryoïde initial se sont présentés (Fig. 4). Les embryoïdes maintenus en milieu liquide n'ont pas évolué.

3. — Structure des embryoïdes observés.

L'étude histologique des structures polarisées issues de CCR, réalisée sur des coupes à mainlevée, a permis de vérifier leur structure d'embryon somatique.

Les observations ultérieures des « structures polarisées » issues de cals primaires ont été faites sur des coupes histologiques sériées. Ces dernières ont montré que l'on était bien en présence d'embryoïdes. Les figures 5 à 8 rappellent celles obtenues par Vallade [1965] à partir de coupes d'embryons de graines de palmier à huile. La figure 5 montre une coupe longitudinale axiale d'un embryon somatique complet où l'on peut voir avec précision l'organisation des méristèmes racinaires et caulinaires ainsi que leur vascularisation bien similaire à celle constatée sur un embryon zygotique, l'haustorium étant absent des embryoïdes. Cette figure montre en outre une excroissance produite par le limbe cotylédonaire. Ceci correspond à un phénomène d'embryogenèse somatique secondaire, précédemment observé à partir d'embryoïdes [Ahée *et al.,* 1981 ; Pannetier *et al.,* 1981]. Des observations similaires ont été réalisées à partir de cultures *in vitro* d'embryons de palmiers à huile par Rabechault *et al.* [1970]. En effet, ils constatent l'apparition de nodules ayant le même caractère de développement que des embryoïdes, à partir du limbe cotylédonaire (Fig. 2). Les tissus du limbe cotylédonaire ont déjà été mentionnés comme étant à l'origine de l'embryogenèse adventive chez la carotte [Halperin et Wetherell, 1964, 1965].

Des travaux plus récents sur l'étude histologique du développement d'embryons adventifs en culture *in vitro* de *Phoenix dactilyfera* L. ont été abordés par Tisserat et De Mason [1980], venant appuyer le phénomène de polyembryonie sur une autre Palmae.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'obtention d'embryons somatiques en milieu liquide est possible. La poursuite de leur développement en pousses feuillées dans ces mêmes conditions de culture présente encore des blocages qu'il devrait être possible de lever. Le repiquage des embryoïdes sur milieu gélosé a permis le développement d'une pousse feuillée. Ce résultat est faible mais encourageant.

L'étude histologique a confirmé la nature embryonnaire des structures polarisées obtenues et a permis de visualiser le phénomène d'embryogenèse adventive (ou secondaire).

Les premiers résultats décrits dans cet article ont permis de voir l'importance que pouvait avoir le type de flaconnage, associé à une certaine vitesse d'agitation, sur l'obtention d'embryons somatiques en milieu liquide, ainsi que l'influence de différentes substances de croissance, en particulier l'équilibre ANA/BAP, sur l'organogenèse des cultures à croissance rapide.

Des proliférations d'embryoïdes à partir d'un premier embryoïde ont déjà été constatées sur milieu solide [Pannetier *et al.,* 1981]. Sur les graminées, les tissus du scutellum présentent des comportements identiques ; les travaux de Vasil et Vasil [1982] sur l'embryogenèse somatique à partir du scutellum d'embryons zygotiques de *Pennisetum americanum* ou d'embryons immatures de *Zea mays* L. [Vasil et Vasil, 1985] en sont une bonne démonstration.

Des cultures d'embryons somatiques ont été réalisées en fermenteur dès 1972 par Kessel et Carr sur *Daucus carota* puis par Street en 1977. Cependant peu de chercheurs se sont intéressés au développement de cette technique. Les articles d'Ammirato [1983] vont mettre en évidence les nombreux avantages de l'embryogenèse somatique en milieu liquide. En effet, les vitro-plants produits par organogenèse ne possèdent pas tous les avantages des embryons somatiques issus de culture de cellules. L'embryogenèse somatique est caractérisée par des structures bipolaires comportant, à la fois, les apex racinaires et caulinaires. En une étape, les deux méristèmes nécessaires pour la croissance d'une plante entière ont été initiés. Au contraire, la voie d'organogenèse ne permet pas, bien souvent, d'obtenir à la fois le développement de la tige et des racines et il est nécessaire de procéder à des séquences de milieux différents pour régénérer une plante entière.

En outre, des cultures embryogènes placées dans des conditions optimales peuvent produire un grand nombre d'embryoïdes par flacon de culture, beaucoup plus que les multiples pousses feuillées produites par une multiplication adventive d'une pousse initiale par organogenèse.

Les embryoïdes cultivés en milieu liquide ont comme caractéristique de se séparer les uns des autres et de flotter librement dans le milieu de culture. Cette caractéristique présente l'avantage d'obtenir des embryoïdes sans séparation manuelle.

La technique de culture et de production d'embryoïdes en milieu liquide présente dès maintenant des possibilités pour une production mécanisée par fermenteur [Gray, 1981 ; Evans *et al.,* 1981].

Durzan [1980] et Murashige [1980] évoquent la possibilité d'utiliser les embryons somatiques comme des graines en les encapsulant afin d'avoir des lots d'embryoïdes disponibles et aisément transportables.

L'aspect technique tel que le type de flaconnage, le système d'agitation (« Roller-bottle », « Roller-tube », table d'agitation), le volume de culture, la densité des cellules dans le milieu et les facteurs de croissance peuvent avoir de grandes influences sur la fréquence d'apparition des embryons somatiques normaux ou anormaux [Ammirato, 1983].

Un autre auteur, Jones [1983], voit aussi dans la culture en milieu liquide une solution d'avenir ; le milieu liquide peut être une alternative pour le palmier à huile. L'auteur voit dans cette orientation la possibilité de réaliser un procédé plus adapté aux biotechnologies automatisées, réduisant le temps de production, le nombre des manipulations et, par là, le coût de la verrerie et de la main-d'œuvre.

Halperin [1966] montre que le nombre de chromosomes, ainsi que la capacité à l'embryogenèse des suspensions cellulaires, ne sont pas affectés par un séjour prolongé en milieu liquide. De plus, selon Smith et Street [1974], la perte du potentiel embryogène arrive plus fréquemment et plus rapidement dans les cultures de cals que dans les suspensions cellulaires. Les récents travaux de Karlsson et Vasil [1986] montrent que deux suspensions cellulaires embryogènes, respectivement de *Panicum maximum* et de *Pennisetum purpureum,* âgées de quatre ans, présentent encore une forte capacité à l'embryogenèse. Cette capacité est maintenue par un régime de subcultures très rapides où les inoculum proviennent de la phase exponentielle de croissance.

Smith et Street [1974] expliquent cette différence par une meilleure accessibilité des cellules et agrégats cellulaires aux composés du milieu, répartis de façon homogène dans le milieu liquide.

En outre, la fréquence des subcultures de suspensions cellulaires peut réduire le développement d'une modification chromosomique éventuelle [Baylis, 1977 ; Evans et Gamborg, 1982 ; Karlsson et Vasil, 1986].

Le milieu liquide peut être utilisé aussi comme une technique intermédiaire entre deux passages sur gélose. Ce séjour en milieu liquide dans le cas de CCR de palmier à huile a une influence importante sur l'augmentation de matière fraîche ainsi que sur la vitesse d'apparition des embryoïdes et leur nombre *[travaux non publiés].* De même, Ho Wai-Jane et Vasil [1983] montrent que l'expression des embryoïdes, dans le cas de la canne à sucre, ne se réalise qu'en effectuant un « plating » de la suspension, contenant les proembryoïdes, sur un milieu gélosé.

Le développement des techniques de cultures en milieu liquide présente un intérêt majeur, soit pour la production de métabolites secondaires, soit pour la production en masse d'embryons somatiques. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que la maintenance de l'intégrité chromosomique et génétique est essentielle si l'on utilise l'embryogenèse somatique à des fins de reproduction clonale [Ammirato, 1983].

Une étude plus systématique des avantages de cette voie reste encore à faire pour le palmier à huile.

BIBLIOGRAPHIE

[1] AHÉE J., ARTHUIS P., CAS S. *et al.* (1981). — La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique (trilingue fr.-angl.-esp.). *Oléagineux,* **36,** N° 3, p. 113-118.

[2] AMMIRATO P. V. (1983). — The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures : Suspension culture techniques and hormones requirement. *Biotechnology,* March, p. 68-74.

[3] AMMIRATO P. V. (1983). — Embryogenesis. *In : Handbook of plant cell culture. Technique for propagation and breeding.* Vol. 1. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y., Ed.

[4] BAYLISS M. W. (1977). — Factors affecting the frequency of tetraploid cells in a predominantly diploid suspension of *Daucus carota. Protoplasma,* **92,** p. 109-115.
[5] CORLEY R. H. V., BARRETT J. N. & JONES L. H. (1977). — Vegetative propagation of oil palm via tissues culture. *Oil Palm News,* **22,** p. 2-7.
[6] DURZAN D. J. (1980). — Progress and promise in forest genetics. *In : Paper Science and Technology. The cutting Edge.* The Institute of Paper Chemistry, Appleton, Wisconsin, U.S.A., p. 31-60.
[7] EVANS D. A. & GAMBORG O. L. (1982). — Chromosome stability of cell suspension cultures of *Nicotiana* species. *Plant Cell Reports,* **1,** p. 104-107.
[8] EVANS D. A., SHARP W. R. & FLICK C. E. (1981). — Growth and behaviour of cell cultures : Embryogenesis and organogenesis. *In : Plant tissue culture : Methods and applications in agriculture* (T. A. Thorpe, ed.). Academic Press, New York, U.S.A., p. 45-113.
[9] GRAY D. (1981). — Fluid drilling of vegetable seeds. *Hort. Rev.,* **1,** p. 1-27.
[10] HALPERIN W. (1966). — Alternative morphogenetic events in cell suspension. *Amer. J. Bot.,* **53,** p. 443-453.
[11] HALPERIN W. & WETHERELL D. F. (1964). — Adventive embryony in tissue cultures on the wild carrot, *Daucus carota. Amer. J. Bot.,* **51,** p. 274-283.
[12] HALPERIN W. & WETHERELL D. F. (1965). — Ontogeny of adventive embryos of wild carrot. *Science,* **147,** p. 756-758.
[13] HANOWER J. & PANNETIER C. (1982). — *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis. Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture,* Akio Fujiwara Ed., p. 745-746.
[14] HO WAI.JANE & VASIL I. K. (1983). — Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bot.,* **51,** p. 719-726.
[15] JONES J. H. (1983). — The oil palm and its clonal propagation by tissue culture. *Biologist,* **30,** 4, p. 181-188.
[16] KARLSSON S. B. & VASIL I. K. (1986). — Growth, cytology and flow cytometry of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* Jacq. and *Pennisetum purpureum* Shum. *J. Plant Physiol.,* **123,** p. 211-227.
[17] KERN H. R., BARWALE U. B., MEYER M. M. & WIDHOLM J. M. (1986). — Correlation of cotyledonary node shoot proliferation and somatic embryoid development in suspension culture of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Cell Reports,* **5,** p. 140-143.
[18] KESSEL R. H. J. & CARR A. H. (1972). — The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot *(Daucus carota)* tissue. *J. Exp. Bot.,* **23,** p. 996-1007.
[19] KONAR R. N. & NATARAJA K. (1965). — Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. plantlets from freely suspended cells and cells groups. *Phytomorphology,* **15,** p. 206-211.
[20] KONAR R. N., THOMAS E. & STREET J. E. (1972). — The diversity of morphogenesis in suspension cultures of *Atropa belladona* L. *Ann. Bot.,* **36,** p. 249-258.
[21] LU C. & VASIL I. K. (1982). — Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum maximum* Jacq. *Amer. J. Bot.,* **69,** p. 77-81.
[22] LUPOTTO E. (1986). — The use of single somatic embryo culture in propagating and regenerating lucerne *(Medicago sativa L.). Ann. Bot.,* **57,** p. 19-24.
[23] MOREL G. & WETMORE R. H. (1951). — Fern callus tissue culture. *Amer. J. Bot.,* **38,** p. 141-143.
[24] MURASHIGE T. (1980). — Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. *In : Plant Growth Substances,* F. Skoog, ed. Springer Verlag, New York, p. 426-434.
[25] MURASHIGE T. & SKOOG F. (1962). — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum,* **15,** p. 473-497.
[26] NITSCH J. P., NITSCH C. & HAMON S. (1969). — Production de *Nicotiana* diploïdes à partir de cals haploïdes cultivés *in vitro. C. R. Ac. Sc.,* Paris, **269,** 14, p. 1275-1277.
[27] NOIRET J. M., GASCON J. P., PANNETIER C. (1985). — La production de palmier à huile par culture *in vitro* (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux,* **40,** N° 7, p. 365-372.
[28] PANNETIER C., ARTHUIS P. & LIEVOUX D. (1981). — Néoformation de jeunes plants 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.
[29] RABECHAULT H., AHÉE J. & GUÉNIN G. (1970). — Colonies cellulaires et formes embryoïdes obtenues *in vitro* à partir de cultures d'embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). *C. R. Acad. Sc. Paris,* **270,** p. 3067-3070.
[30] RABECHAULT H. & MARTIN J. P. (1976). — Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. *C. R. Acad. Sci. Paris,* **283,** p. 1735-1737.
[31] RAJASEKHAR E. W., EDWARDS M., WILSON S. B. & STREET H. E. (1971). — Studies on the growth in culture of plant cells. XI. — The influence of shaking rate on the growth of suspension cultures. *J. Exp. Bot.,* **22,** p. 107-117.
[32] SMITH S. M. & STREET H. E. (1974). — The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann. Bot.,* **38,** p. 223-241.
[33] STEWARD F. C. & MAPES M. O. (1971). — Morphogenesis and plant propagation in aseptic culture of *Asparagus. Bot. Gaz.,* **132,** p. 70-79.
[34] STEWARD F. C., MAPES M. O. & MEARS K. (1958). — Growth and organized development of cultured cells. II. — Organisation in cultures from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.,* **45,** p. 705-708.
[35] STEWARD F. C., MAPES M. O., KENT A. E. & HOLSTEN R. D. (1964). — Growth and development of cultured plant cells. *Science,* **143,** p. 20-27.
[36] STREET H. E. (1977). — *Plant Tissue and Cell Culture,* 2nd ed., Univ. California Press, Berkeley, U.S.A.
[37] TISSERAT B. & De MASON D. A. (1980). — A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. *Ann. Bot.,* **46,** p. 465-472.
[38] TORREY J. G. & SHIGEMURA (1957). — Growth and controlled morphogenesis in pea root callus tissue grown in liquid media. *Amer. J. Bot.,* **44,** p. 334-344.
[39] VALLADE J. (1965).. — Recherches morphologiques et cytologiques sur l'embryon d'*Elaeis guineensis* Jacq. quiescent et en cours de germination. *D. E. S. Faculté des Sciences,* Dijon, Fr.
[40] VASIL V. & VASIL I. K. (1981). — Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet *(Pennisetum americanum). Ann. Bot.,* **47,** p. 559-678.
[41] VASIL V. & VASIL I. K. (1982). — The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. — *In cultured immature embryos. Bot. Gaz.,* **143,** 4, p. 454-465.
[42] VASIL I. K. & HILDEBRANDT A. C. (1966) — Variations of morphogenetic behaviour in plant tissue cultures. I. — *Cichorium endivia. Am. J. Bot.,* **53,** p. 860-869.
[43] VASIL V., LU C. Y. et VASIL I. K. (1985). — Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize *(Zea mays* L.*). Protoplasma,* **127,** p. 1-8.
[44] WILMAR C. & HELLENDOORN M. (1968). — Growth and morphogenesis of *Asparagus* cell cultures *in vitro. Nature,* **217,** p. 369-370.

SUMMARY

Somatic embryogenesis on a liquid medium with oil palm : *Elaeis guineensis* Jacq. and *E. guineensis* × *E. melanococca*. Initial results.

B. MALAURIE, *Oléagineux,* 1987, **42,** N° 6, p. 217-222.

Embryoid type structures were obtained on a liquid medium using rapid growing cultures (RGC) and primary calluses from several oil palm clones (*E. guineensis* and interspecific hybrids). Only the embryoids obtained from primary calluses continued to develop into plantlets. Embryoid type polarized structures appeared after transferring the cultures to a liquid medium (96 days for the interspecific hybrid, 51 days for *E. guineensis*). One of these structures, which came from an interspecific hybrid primary callus, subsequently developed into a shoot. The embryoid character of the formations obtained was confirmed through histological examination. This also made it possible to reveal a secondary or adventive embryogenesis phenomenon which arises from the cotyledonary lamina of the embryoid.

RESUMEN

Embriogénesis somática en medio líquido de la palma africana : *Elaeis guineensis* Jacq. y *E. guineensis* × *E. melanococca*. Primerós resultados.

B. MALAURIE, *Oléagineux,* 1987, **42,** N° 6, p. 217-222.

Estructuras de tipo embrioides se obtuvieron en un medio líquido a partir de cultivos de crecimiento rápido (CCR) y de callos primarios pertenecientes a varios clones de palma africana (*E. guineensis* e híbridos interespecíficos). Embrioides obtenidos a partir de callos primarios fueron los únicos que prosiguieron su desarrollo hasta la etapa de plántula. Despuès de un subcultivo en un medio líquido aparecieron estructuras polarizadas de tipo embrioides (a los 96 días para el híbrido interespecífico y a los 51 días para *E. guineensis*). Una de las mismas, procedente de callo primario del híbrido interespecífico, llegó, a formar más tarde un callo con hojas. Este carácter de embrioide de las formaciones obtenidas se confirmó con exámenes histológicos. Por otro lado éstos permitieron que se evidenciara un fenómeno de embriogénesis secundaria o adventicia a partir de los tejidos del limbo de los cotiledones del embrioide.