

pers. n° 40

Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par culture *in vitro* Stratégie et résultats (1)

Y. DUVAL (2), T. DURAND GASSELIN (3), K. KONAN (3) et C. PANNETIER (4*)

Résumé. — La multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) s'est développée en utilisant la voie de l'embryogénèse somatique sur calcs de divers organes. Le passage par calcs présente des risques quant à la stabilité génétique. De plus, la production de masse nécessite la prolifération des tissus cultivés *in vitro*. Cette prolifération peut intervenir soit au niveau des calcs soit au niveau des embryoides. Dans le premier cas, il s'agit de la prolifération de tissus indifférenciés dans des conditions favorisant une croissance rapide (milieux de culture riches en auxines — le plus souvent chlorés) et pendant des délais qui peuvent être longs. Dans le second cas, les embryons sont produits sur calcs issus de fragments foliaires et subcultivés en conditions ne favorisant pas une croissance rapide. Les embryoides sont ensuite multipliés par un phénomène d'embryogénèse adventive sans apport de substances de croissance. Ces conditions doivent être plus favorables à la production de plants « conformes ». Cette voie a été développée et appliquée à plus de 200 arbres âgés de 20 à 25 ans sélectionnés pour leurs qualités agronomiques, au laboratoire de La Mé en Côte d'Ivoire. Tous les arbres utilisés ont donné des calcs, 40 p. 100 d'entre eux ont fourni des embryons somatiques après 1 an de culture *in vitro*. Les rendements sont meilleurs en utilisant des individus plus jeunes, de 7 à 9 ans (70 p. 100 donnent des embryoides après 4 mois de culture). De 1983 à 1986, 44 clones ont été plantés sur 38 hectares. Les plantations 1983 et 1984 présentent 100 p. 100 d'individus aux caractéristiques normales en particulier au niveau des régimes ; l'analyse de la production est en cours.

INTRODUCTION

Les caractéristiques biologiques du palmier à huile ne permettent pas d'utiliser certaines techniques classiques de culture *in vitro*, mises généralement au point sur les dicotylédones, comme la culture de méristèmes ou le microbouturage. De ce fait, tous les chercheurs ayant réussi la multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile ont utilisé des processus d'embryogénèse somatique sur calcs [Jones, 1974 ; Rabéchault et Martin, 1976 ; Paranjothy et Othman, 1982 ; Nwanko et Krikorian, 1983].

Il est généralement admis que le passage par un tissu différencié présente des risques non négligeables de variabilité des plantes obtenues par rapport à l'individu de départ. L'absence d'alternative dans le choix de la voie utilisée, et les risques liés à la méthode, ont fait partie des préoccupations des chercheurs dès le début des travaux sur la micropropagation du palmier à huile [Smith et Jones, 1970 ; Noiret, 1981]. Après l'obtention des premiers vitroplants, les essais aux champs ont montré une série de résultats encourageants [Corley *et al.*, 1977], malgré l'apparition de plants présentant des anomalies de vitesse de croissance et de port foliaire [Corley *et al.*, 1981]. Plus récemment, des anomalies de l'appareil reproducteur ont été rap-

portées ; leur fréquence d'apparition a été corrélée à la durée de culture *in vitro* à certains stades [Corley *et al.*, 1986].

Dès l'obtention des premiers vitroplants [Rabéchault et Martin, 1976], ces risques de variation ont été pris en compte par les chercheurs de l'IRHO. Une stratégie portant sur les méthodes de culture *in vitro* et sur la mise en place d'essais au champ a été élaborée, ce qui a entraîné une modification profonde du procédé d'obtention des vitroplants [Pannetier *et al.*, 1981].

Le dispositif de recherche correspondant, mis en place par l'IRHO, comprend l'équipe de chercheurs ORSTOM/IRHO travaillant dans le laboratoire de Bondy (France), un laboratoire expérimental installé sur la Station de La Mé (Côte d'Ivoire) depuis 1981 et une équipe de généticiens et sélectionneurs travaillant en France et Outre-mer.

Des recherches sont conduites par l'équipe de chercheurs ORSTOM/IRHO de Bondy travaillant en étroite collaboration avec des laboratoires spécialisés de l'Université, du CNRS (5), de l'INRA (5) et du CIRAD (5).

Le laboratoire expérimental de la Station de La Mé réalise un programme de création de clones et de production de vitroplants nécessaires aux essais en champ. Ce programme permet d'étudier en même temps des améliorations méthodologiques et de tester le procédé au stade pilote.

Enfin l'équipe de généticiens et sélectionneurs étudie les aspects théoriques et pratiques de l'utilisation de la culture *in vitro* pour l'amélioration du palmier à huile et la diffusion du matériel clonal.

(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 végétale, S.S.C. de l'ORSTOM, 70-74, Route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

(3) IRHO-CIRAD, Station de La Mé. B.P. 13 Bingerville (Côte d'Ivoire).

(4) IRHO-CIRAD, Laboratoire de Physiologie végétale, S.S.C. de l'ORSTOM, 70-74, Route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

* *Personne à laquelle les demandes de tirés-à-part doivent être adressées.*

Fonds Documentaire ORSTOM



010005481

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : ~~BX~~ 5481 Ex : 2

I. — MÉTHODOLOGIE

Le programme de recherches sur la multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile à l'IRHO comprend la sélection des arbres à cloner, la mise au point d'une méthode de micropropagation et un ensemble de tests sur les clones obtenus.

On traitera ici uniquement des questions concernant la culture *in vitro* et le test des clones. La sélection des arbres à cloner et les conséquences de la multiplication végétative sur le programme d'amélioration ont fait l'objet de plusieurs publications [Noiret *et al.*, 1981 ; Baudouin *et al.*, 1987 ; Meunier *et al.*, 1987].

Méthodologie *in vitro*.

La seule voie actuellement connue pour la micropropagation du palmier à huile est l'embryogenèse somatique sur cal [Blake, 1983]. Des variantes méthodologiques, portant sur le choix de l'explant et le type de cal utilisé, ont été rapportées et différentes conditions de culture peuvent probablement conduire à des résultats positifs.

Dans la mesure où l'objectif est la production de grandes quantités de plants conformes, on doit prendre en compte les potentialités de multiplication de masse et les risques de variation soma-clonale.

D'un point de vue théorique, il est connu que la méthode utilisée (néoformation sur cal) est susceptible d'induire des variations [Reisch, 1983] pouvant résulter de différentes causes (culture de tissus dédifférenciés, utilisation d'auxines de synthèse, durée de la culture *in vitro*...).

La méthode [Rabéchault et Martin, 1976], qui a permis l'obtention des premiers vitroplants nécessitait le passage par un tissu très dédifférencié qui présentait un taux de croissance très élevé (doublement tous les 10-20 jours), appelé cal à croissance rapide (CCR). Les embryons somatiques étaient ensuite obtenus à partir de ce tissu.

L'utilisation des CCR présentait les caractéristiques suivantes :

- ils étaient obtenus à la suite de subcultures prolongées de cals primaires issus d'explants foliaires ;
- l'apparition des CCR avait une fréquence faible et ces tissus semblaient provenir d'un petit nombre de cellules de cals primaires ;
- l'amplification des cultures (pour une production industrielle de vitroplants) devait être faite par multiplication des tissus au stade CCR et sur des milieux riches en auxine chlorée.

Ces caractéristiques ont été jugées défavorables pour obtenir une bonne conformité et une bonne homogénéité des clones, et des recherches ont été entreprises avec pour objectifs :

- l'obtention de néoformations sur cals primaires,
- l'amplification des cultures par multiplication de ces néoformations,
- la réduction (dose-durée) de l'utilisation de phytohormones.

Un nouveau procédé a été mis au point [Pannetier *et al.*, 1981] qui permet l'obtention d'embryons somatiques à partir d'un petit nombre de structures embryogènes apparaissant sur des cals issus de fragments de jeunes feuilles cultivés en présence de 2,4-D.

La production de masse est ensuite assurée par la mise en place d'un phénomène d'embryogenèse secondaire, ce qui permet d'établir des souches d'embryoïdes en prolifération.

Ce phénomène d'embryogenèse secondaire, qui n'est pas parfaitement expliqué d'un point de vue biologique, présente les caractéristiques suivantes :

- il se réalise sans apport de régulateur de croissance exogène ;
- il peut être illimité dans le temps : des souches d'embryoïdes en prolifération sont cultivées depuis sept années au laboratoire de Bondy sans présenter de modifications de comportement ou d'aspect ;
- il permet la production de masse de matériel *in vitro* en entraînant une croissance exponentielle des souches d'embryoïdes, et une production simultanée de pousses feuillées par le développement des embryoïdes les plus âgés.

Ce processus permet la constitution d'une banque de clones sous forme de souches d'embryoïdes en prolifération qui peut être gérée d'une manière relativement simple pour assurer une production à l'échelle industrielle. De plus, les résultats obtenus grâce aux techniques de cryoconservation [Engelmann *et al.*, 1985] permettent de stocker des souches d'embryoïdes pendant de longues périodes en bloquant toute activité cellulaire, et donc devant exclure tout risque de variation.

Cette méthode d'embryogenèse directe sur cal primaire présente plus de garantie pour la conformité et l'homogénéité du matériel clonal pour les raisons suivantes :

- les cals sont cultivés dans des conditions limitant leur croissance, et l'on tente de raccourcir au maximum la phase cal ;
- la multiplication des tissus est réalisée sur des cultures d'embryoïdes, donc sur des structures plus organisées que des cals, et sans apport de phytohormones ;
- lorsque l'introduction d'auxines dans les milieux de culture est essentielle (explants, cals), leur concentration a été réduite au maximum ; elles ont été totalement supprimées pour les étapes où elles ne sont pas indispensables.

Essais clonaux.

La réalisation d'essais clonaux a pour objectif, d'une part de s'assurer de la conformité du matériel produit et d'autre part de rechercher les meilleurs clones d'un point de vue agronomique. Toute modification importante du procédé de propagation *in vitro* nécessite de nouveaux essais pour vérifier l'incidence éventuelle de ces modifications. C'est la raison pour laquelle l'IRHO a attendu le résultat des recherches sur le procédé avant d'entreprendre un programme important de création de clones et de production de vitroplants.

Le matériel végétal produit est contrôlé :

- 1) en plantant au champ les premiers vitroplants obtenus de chaque clone, ce qui permet de s'assurer rapidement de la conformité du matériel ;
- 2) en répétant tous les ans la plantation d'un échantillon de clones afin de connaître la stabilité des cultures dans le temps.

Une série d'essais est également nécessaire afin de déterminer l'influence de la cryoconservation sur le comportement des vitroplants produits à partir de cultures d'embryoïdes conservées dans l'azote liquide.

La plupart de ces essais sont en même temps des essais comparatifs de clones car ils sont plantés suivant un dispositif statistique en lattice équilibré ou en blocs randomisés avec 6 répétitions. La parcelle élémentaire a 16 arbres afin de disposer de 4 arbres internes pour lesquels les effets de compétition entre clones sont éliminés. Une seule densité est uti-

lisée pour le moment, 143 arbres/ha, mais il est prévu de réaliser des essais de densité avec les clones les plus intéressants et dont l'encombrement serait réduit.

Un clone témoin et des croisements témoins sont systématiquement utilisés dans les essais. Les croisements témoins sont ceux dans lesquels on a choisi les têtes de clones de l'essai.

Certains essais sont répétés dans des conditions écologiques différentes afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions génotype × environnement et des plantations semi-industrielles de 5 à 25 ha par clone sont plantées pour étudier les problèmes culturaux posés par ce nouveau matériel.

Par ailleurs, le comportement des clones vis-à-vis de la fusariose est testé au stade pré-pépinière comme pour le matériel sexué et les clones les plus tolérants à l'issue de ce test seront plantés dans une zone très infestée par la maladie [Renard *et al.*, 1972].

Enfin des mesures de l'activité mitochondriale sont effectuées depuis peu sur tous les clones à partir de racines prélevées sur des plants de 6 mois. L'objectif est d'utiliser les résultats de ces mesures biochimiques pour faire un tri des clones les plus prometteurs comme on le pratique déjà actuellement sur les croisements [Kouamé et Noiret, 1981].

II. — PROGRAMME ET RÉSULTATS

Le développement du procédé ORSTOM/IRHO de micropropagation du palmier à huile a conduit à l'installation d'un laboratoire expérimental sur la Station principale de La Mé en Côte d'Ivoire.

Cette unité de 350 m² emploie 17 personnes, permet le clonage annuel de 40 arbres, elle a une capacité de production de 150 000 vitroplants/an.

Le programme de ce laboratoire est, d'une part la recherche d'améliorations méthodologiques pour le passage à l'échelle pilote, d'autre part la production des plants nécessaires aux essais, et enfin la création d'une banque de souches embryoides qui permettra, lorsque les essais aux champs auront confirmé la valeur de la méthode, de passer directement à la production industrielle.

Depuis l'ouverture de cette unité en 1981, le clonage de 198 palmiers âgés de 20 à 25 ans, sélectionnés pour leur qualité agronomique et appartenant à 30 croisements, a été tenté.

Performance du procédé.

Le procédé utilisé a permis l'obtention de cals sur tous les palmiers prélevés. La variabilité observée pendant

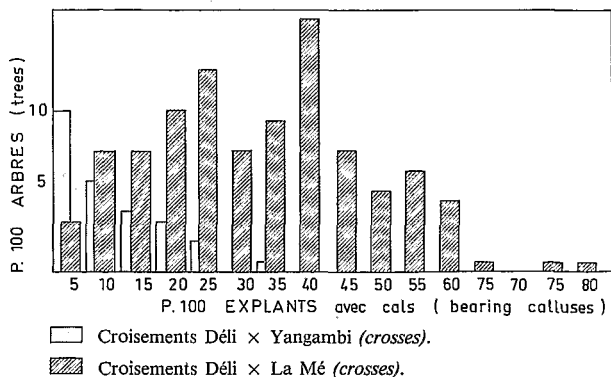


FIG. 1. — Callogenèse sur 151 palmiers (*Callogenesis on 151 palms*). —

l'étape callogenèse est due en partie à l'origine génétique des arbres utilisés (Fig. 1). Dans les mêmes conditions de culture, le rendement cal/explant est de 25 à 30 p. 100 en moyenne pour les croisements d'origine Déli × La Mé (DE × LM) et de 5 à 10 p. 100 pour les croisements d'origine Déli × Yangambi (DE × YA). A l'intérieur d'un même type de croisement, une variabilité importante est observée (de quelques p. 100 à 80 p. 100 pour les arbres d'origine DE × LM), sans que les causes principales de ce phénomène aient pu être formellement identifiées.

Par ailleurs, on a noté une hétérogénéité importante dans l'aspect des néoformations, avec un taux élevé de structures racinaires pour les croisements d'origine DE × YA.

L'embryogenèse sur cal primaire a été testée sur 188 clones et des formations embryogènes ont pu être observées dans 137 cas. La fréquence d'apparition d'embryons somatiques est liée au temps d'incubation des cals en « conditions embryogènes » (Fig. 2). Dans le cas de palmiers âgés de 20 à 25 ans, après 12 mois de culture des cals, 44 p. 100 des clones présentent des néoformations, 75 après 24 mois et près de 100 p. 100 peuvent être atteints après 40 mois de culture. Toutefois, en considérant les risques d'induction de variabilité *in vitro*, il est théoriquement défavorable de maintenir pendant de longues périodes des tissus indifférenciés sur des milieux contenant des phytohormones. Des résultats récents, obtenus sur une trentaine d'arbres dans un autre laboratoire utilisant le même procédé ont montré qu'une amélioration sensible peut être observée en utilisant des palmiers âgés de 9 à 10 ans.

Dans ce cas, le taux de succès est de 70 p. 100 après quatre mois d'incubation en conditions embryogènes.

De même, quatre palmiers de pépinière, clonés en 1979 par Pannetier *et al.*, [1981], avaient tous présenté une embryogenèse après trois à quatre mois de culture des cals.

Ces observations peuvent être rapprochées des résultats classiques observés sur d'autres plantes pérennes montrant que la réussite de la micropropagation *in vitro* est directement liée à l'âge des plantes-mères [Bajaj, 1984].

La brièveté du temps de culture de tissus indifférenciés étant favorable à la multiplication conforme, on peut considérer que l'utilisation de jeunes palmiers est un facteur positif.

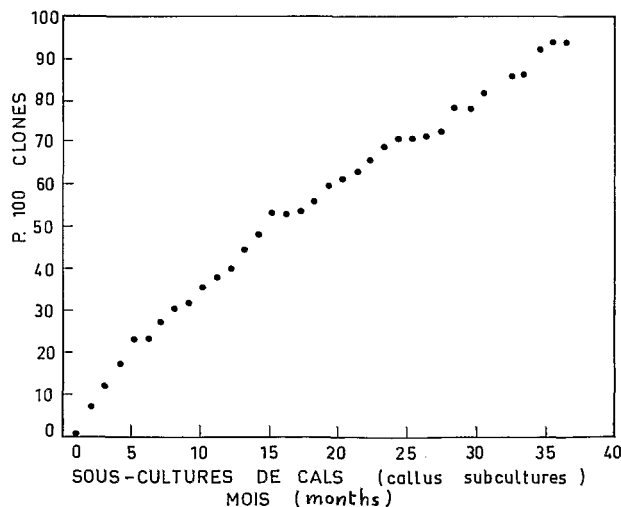


FIG. 2. — Pourcentage cumulé de palmiers donnant des embryons somatiques. (*Cumulative percentage of palms giving somatic embryos*).

La production de masse est assurée par l'obtention et le maintien du phénomène d'embryogenèse secondaire. Les premiers travaux réalisés sur les souches d'embryoïdes en prolifération ont montré que l'utilisation de phytohormones n'est pas indispensable à cette étape. Cette propriété a été estimée comme favorable à l'obtention de plants conformes, et les travaux de mise au point des milieux de culture ont porté sur la plupart des constituants, à l'exception des phytohormones dont l'utilisation a été systématiquement exclue. En 1984, après trois années d'activité, 5 p. 100 des clones embryogènes produisaient des embryoïdes permettant l'obtention de souches en prolifération. Des améliorations significatives ont été obtenues et une meilleure connaissance du matériel végétal ainsi que l'accroissement du savoir-faire pour la culture des embryoïdes ont permis au laboratoire de La Mé de disposer à fin 1986 de souches appartenant à 36 clones différents et représentant 27 p. 100 des clones embryogènes. Compte tenu de l'évolution des résultats (Tabl. I), il est probable que ces chiffres seront améliorés dans les prochains mois.

Production de vitroplants.

Le développement des embryons somatiques à partir des souches en prolifération s'effectue en deux étapes dans nos conditions de culture. L'enracinement spontané est rare et ne conduit qu'à un système racinaire insuffisant pour le transfert en conditions naturelles.

Le développement de l'apex caulinaire intervient en premier ; lorsque les pousses ont atteint 5 à 7 cm (après 4 à 6 mois de culture), une étape d'enracinement est réalisée. Cette induction provoquée de la rhizogenèse présente deux avantages : d'une part elle conduit à la formation d'un système racinaire vigoureux avec un taux de succès de 80 p. 100 en moyenne et, d'autre part, elle permet de synchroniser la production de vitroplants pour le passage en pépinière.

Le laboratoire de La Mé a produit plus de 137 000 vitroplants appartenant à 59 clones différents entre 1983 et 1986 (Tabl. II). L'augmentation de la production est une conséquence, à la fois du nombre de clones disponibles et d'une meilleure connaissance du phénomène d'embryogenèse secondaire dont la maîtrise était sensiblement améliorée en 1985-1986 (Tabl. I).

Si l'on considère la répartition de la production par clone, 22 clones ont produit plus de 1 000 vitroplants et,

parmi eux, 3 ont produit plus de 10 000 plants. Ceci correspond approximativement aux souches d'embryoïdes en prolifération disponibles fin 1985, et ce nombre devrait atteindre 36 en 1987.

Les vingt-quatre clones ayant produit moins de 100 vitroplants n'ont pas encore permis la production de souches d'embryoïdes en prolifération à fin 1986. Dans ce cas, des structures à potentialité embryogène ont été obtenues sur les cals, quelques embryons somatiques ont été produits mais le phénomène d'embryogenèse secondaire n'est pas encore établi et la production de vitroplants est donc faible.

Essais aux champs — Station de La Mé.

De 1983 à 1986, 44 clones ont été plantés en essais comparatifs et 24 nouveaux clones le seront en 1987. Exception faite de trois clones plantés en 1983 provenant de plants au stade pépinière clonés à Bondy (France) tous les clones ont été produits au laboratoire de La Mé à partir d'arbres adultes. Dans tous les cas, la méthode d'embryogenèse sur cal primaire est utilisée ; les pousses feuillées ont été enracinées moins d'un an après l'embryogenèse.

Toutes les inflorescences mâles et femelles observées pour les plantations de 1983 à 1985 sont normales (Tabl. III). Pour les plantations 1983 et 1984, les analyses de production sont en cours mais sont encore trop partielles pour être exploitées. Dans tous les cas, l'aspect végétatif est parfaitement normal.

Par ailleurs, deux clones produits par embryogenèse sur CCR ont été plantés à La Mé en 1984 et 1985 (Tabl. IV). Le premier, planté en 1984, a présenté des floraisons mâles et femelles anormales, analogues à celles observées sur les clones produits par Unifield T. C. [Corley, 1986].

On observe pour les inflorescences femelles, un développement des staminodes en pièces charnues s'accompagnant au niveau du fruit d'un avortement ou d'un développement parthénocarpique. Dans le cas des inflorescences mâles, on observe également un développement anormal des étamines en pièces charnues.

Il semble par ailleurs que cette anomalie de la morphogénèse florale s'accompagne d'anomalies du port végétatif visible au jeune âge [Ollagnier, *communication personnelle*].

L'uniformité des 208 individus plantés montre que ces anomalies ne résultent pas d'un événement fortuit mais que

TABLEAU I. — Evolution du nombre de clones utilisables en production industrielle
(Evolution in the number of clones usable in mass production)

	Clones embryogènes (Embryogenic clones)	Culture en production industrielle (Culture in mass production)	p. 100
Juillet (July)	1984 64	3	5
	1985 84	10	12
	1986 107	26	24
Décembre (December)	1986 132	36	27

TABLEAU II. — Production annuelle de vitroplants
(Annual production of plantlets)
Laboratoire de La Mé (Laboratory) — Côte d'Ivoire

Années (Years)	Production de vitroplants (Plantlet production)	Nombre de clones (Number of clones)
1983	2 324	9
1984	12 408	28
1985	52 010	24
1986	70 962	46
1987	150 000 (1)	
Total 1983-1986	137 714	50 (2)

(1) Prévisions pour 1987 (Forecasts for 1987).

(2) 33 clones ont été utilisés au moins 2 années différentes (33 clones have been used in at least 2 different years).

la méthode utilisée mettant en œuvre des tissus très différenciés, cultivés pendant des temps longs sur des milieux riches en auxines, peut être incriminée.

Un autre clone, planté en 1985, obtenu par embryogenèse sur CCR en présence d'anti-auxines présente la même anomalie sur les inflorescences mâles, les plants étant encore trop jeunes pour avoir pu permettre l'observation des inflorescences femelles. Simultanément, des vitroplants produits par embryogenèse directe sur cal primaire du même individu présentent une morphogenèse mâle normale.

Le phénomène CCR semble donc bien devoir être mis en cause dans l'apparition d'anomalies.

Essais multilocaux et semi-industriels.

Depuis 1986, un essai multilocal a été mis en place sur sept sites différents situés en Asie, Amérique du Sud et Afrique pour permettre d'étudier le comportement des clones dans diverses conditions environnementales. Dix neuf clones seront livrés entre 1986 et 1987 au stade prépépinière pour réaliser ces essais.

Par ailleurs, du matériel clonal a été ou sera fourni à toutes les sociétés de plantations désirant mettre en place des essais semi-industriels en réalisant des parcelles de 5 à 25 ha, afin d'étudier le comportement des plants issus de la culture *in vitro*. Sur des surfaces importantes et d'étudier les pratiques culturales appropriées à ce genre de matériel.

III. — CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés depuis plus de quinze années en France, puis en Côte d'Ivoire, ont permis de maîtriser un procédé de multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile.

Des améliorations méthodologiques, obtenues à toutes les étapes, et particulièrement sur l'obtention de souches d'embryoïdes en prolifération, ont permis la production de plus de 1 000 plants pour 22 clones différents et de plus de 10 000 plants pour 3 clones, ce qui met en évidence les possibilités de la méthode.

Si l'on ajoute à ces résultats la réalisation d'une banque de souches d'embryoïdes provenant de 36 clones différents, il est maintenant possible d'envisager un développe-

ment industriel du procédé, la méthodologie *in vitro* n'étant plus un facteur limitant à l'extension de cette technologie.

Les premiers résultats obtenus dans les essais aux champs sont eux-mêmes très encourageants : aucun des palmiers produits par embryogenèse directe sur cal ne présentent d'anomalie. A l'inverse, les vitroplants produits par embryogenèse sur CCR présentent tous une anomalie de la morphogenèse florale identique à celle observée par d'autres équipes et utilisant un procédé différent.

On peut penser que l'anomalie du système reproducteur rapportée par Corley [1986], et que l'on retrouve sur les vitroplants de La Mé issus de CCR, est la conséquence d'une perturbation pouvant être induite par différents facteurs et apparaissant de préférence à d'autres anomalies.

Dans notre cas, le passage par CCR est en cause, tandis que selon Corley [1986], le temps de culture *in vitro* serait à l'origine de ce désordre.

Si l'on admet que la cible responsable de ce phénomène est l'une des premières touchées par une utilisation inadéquate de la culture *in vitro*, on peut penser qu'une méthode produisant des vitroplants présentant une morphogenèse florale normale sera conservatrice pour tous les autres caractères. Les plants devraient donc présenter une conformité satisfaisante.

Ces hypothèses seront vérifiées par les résultats des essais aux champs mis en place actuellement.

En ce qui concerne l'influence du temps passé *in vitro*, les observations ont été réalisées à La Mé sur des plants produits moins d'un an après l'embryogenèse sur cal et nous ne disposons actuellement d'information sur ce point précis sur pour une seule souche d'embryoïdes. Celle-ci a fourni des plants utilisés en Côte d'Ivoire en 1983, en Indonésie et au Cameroun en 1985 deux ans et demi plus tard. Dans tous les cas, les inflorescences sont normales, mais les informations portent sur un nombre faible d'individus. La plantation systématique de mêmes clones pendant plusieurs années est en cours et l'apparition des premières inflorescences permettra de confirmer ces résultats.

A l'heure actuelle, les anomalies que nous avons observées peuvent être liées à une cause méthodologique connue : le passage par cultures de cal à croissance rapide (CCR), voie qui n'est plus utilisée par l'IRHO pour la production de clones de palmier à huile. Aucune information actuellement disponible ne remet en cause la méthode de multiplication végétative retenue et mise au point après des choix théoriques clairement définis.

TABLEAU III. — Vitroplants obtenus par embryogenèse sur cals primaires

(Plantlets obtained by embryogenesis on primary calluses
Plantation de La Mé (Côte d'Ivoire)

Années (years)	Nombre de (Number of)		P. 100 floraison normale (normal flowering)
	Clones	Plants (Plantlets)	
1983	3	93	100
1984	11	1 042	100
1985	25	1 399	100
1986	16	788	—
Total	44 (1)	3 312	—

(1) 11 clones ont été plantés 2 années successives (11 clones have been planted in 2 successive years).

TABLEAU IV. — Vitroplants obtenus par embryogenèse sur culture à croissance rapide — CCR —

(Plantlets obtained by embryogenesis on fast growing cultures — FGC)

Plantation de La Mé (Côte d'Ivoire)

Années (years)	Nombre de (Number of)		P. 100 floraison normale (normal flowering)
	Clones	Plants (Plantlets)	
1984	1	208	0
1985	1	15	0
Total	2	223	—

RÉFÉRENCES

- [1] BAJAJ Y. P. S. (1984). — Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 1 (Ed. Y. P. S. Bajaj) p. 1-23, Berlin, Springer-Verlag.
- [2] BAUDOUIN L., ASMADY et NOIRET J. M. (1987). — Importance des facteurs de l'environnement dans le choix des têtes de clones chez le palmier à huile. Communication présentée aux « 1987 International oil palm/palm oil conferences; Progress and prospects », 23-26 juin 1987 à Kuala Lumpur (Malaisie); et *Oléagineux*, 42, N° 7 (bilingue fr.-angl.), p. 263-269.
- [3] BLAKE J. (1983). — Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. *Tissue Culture of Trees* (Ed. J. H. DODDS), p. 29-50, Westport, AVI Publisher.
- [4] CORLEY R. H. V., BARRET J. N., and JONES L. H. (1977). — Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. *Oil Palm News*, 22, p. 2-7.
- [5] CORLEY R. H. V., WONG C. Y., WOOI K. C., and JONES L. H. (1981). — Early results from the first oil palm clone trials. *The Oil Palm in Agriculture in the Eighties*, Vol. 1 (Ed. E. Pushparajah and P. S. Chew), p. 173-196, Kuala Lumpur, Incorporated Society of Planters.
- [6] CORLEY R. H. V., LEE C. H., LAW L. H., and WONG C. Y. (1986). — Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter*, 62, p. 233-240.
- [7] ENGELMANN F., DUVAL Y. and 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. Sc. Paris*, 301, Série III, N° 3, p. 111-116.
- [8] JONES L. H. (1974). — Propagation of Clonal Oil Palm by Tissue Culture. *Oil Palm News*, 17, p. 1-8.
- [9] KOUAMÉ B., NOIRET J. M. (1981). — Test précoce de la productivité chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par mesure des activités mitochondriales (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 36, N° 11, p. 533-542.
- [10] MEUNIER J., BAUDOUIN L., NOUY B. et NOIRET J. M. (1987). — The expected value of oil palm clones. Communication présentée aux « 1987 International oil palm/palm oil conferences; Progress and prospects », 23-26 juin 1987 à Kuala Lumpur (Malaisie); et *Oléagineux*, 43 (à paraître).
- [11] NOIRET J. M. (1981). — Application de la culture *in vitro* à l'amélioration et à la production de matériel clonal chez le palmier à huile (trilingue fr.-angl.-esp.). *Oléagineux*, 36, N° 3, p. 123-126.
- [12] NWANKO B. A. and KRIKORIAN A. D. (1983). — Morphogenetic Potential of Embryo and Seedling. Derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *Pisifera* Becc. *Annals of Botany*, 51, p. 65-76.
- [13] PANNETIER C., ARTHUIS P. et LIÉVOUX D. (1981). — Néofor- mation de jeunes plantes de *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.
- [14] PARANJOTHY K. and OTHMAN R. (1982). — *In vitro* propagation of oil palm. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture* (Ed. Fujirawa, A.), p. 747-748, Tokyo, Japanese Association for Plant Tissue Culture.
- [15] RABÉCHAULT H. et MARTIN J. P. (1976). Multiplication végétative du palmier à huile (*E. guineensis* Jacq.) à l'aide de tissus foliaires. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 238, Sér. D, p. 1735-1737.
- [16] REISCH B. (1983). — Genetic Variability in Regenerated Plants. *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1. (Ed. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y.), p. 748-769. New York, MacMillan Publ. Co.
- [17] RENARD J. L. GASCON J. P., BACHY A. (1972). — Recherche sur la fusariose du palmier à huile (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 27, N° 12, p. 581-591.
- [18] SMITH W. K. and JONES L. H. (1970). — Plant Propagation through Cell Culture. *Chemistry and Industry*, 44, p. 1399-1401.

SUMMARY

***In vitro* vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Strategy and results.**

Y. DUVAL, T. DURAND GASSELIN, K. KONAN and C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1988, 43, p. 39-47.

The vegetative propagation of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) has been developed through somatic embryogenesis on calluses of various organs. Passing through the callus stage presents certain risks with respect to genetic stability. Furthermore, mass production requires the proliferation of tissues cultured *in vitro*. Proliferation may involve either calluses or embryoids. In the first case, it involves the proliferation of undifferentiated tissues under conditions favouring rapid growth (auxin-rich culture media — more often than not chlorinated) and sometimes over quite long periods. In the second case, somatic embryos are produced under conditions which do not favour rapid growth. Embryoids are then multiplied through an adventitious embryogenesis phenomenon, with no added growth substances. These conditions should be more propitious to the production of true-to-type plantlets. This process has been developed and applied to more than 200 trees between 20 and 25 years old, selected for their agronomical qualities, at the La Mé laboratory in Côte d'Ivoire. All the trees used gave calluses and 40 p. 100 of them gave somatic embryos after a year of *in vitro* culture. Yields were better if younger individuals were used — 7 to 9 years (70 p. 100 give embryoids after 4 months of culturing). From 1983 to 1986, 44 clones were planted on 38 hectares. The 1983 and 1984 plantings have 100 p. 100 of individuals with normal characteristics, particularly with respect to bunches; production is currently being analyzed.

RESUMEN

Propagación vegetativa de la palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) por cultivo *in vitro*. Estrategia y resultados.

Y. DUVAL, T. DURAND GASSELIN, K. KONAN y C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 2, p. 39-47.

La propagación vegetativa de la palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) ha sido desarrollada utilizando la vía de la embriogénesis somática sobre callos de varios órganos. El paso por la etapa de callos lleva consigo riesgos para la estabilidad genética. Además, la producción masiva necesita la proliferación de tejidos cultivados *in vitro*. Esta proliferación puede ocurrir bien sea en la etapa de callos, o en la de embrioides. Dentro del primer caso, se trata de la proliferación de tejidos no diferenciados dentro de condiciones que favorecen un crecimiento rápido (medios de cultivo ricos en auxinas, cloradas las más veces), y por plazos que pueden ser largos. Dentro del segundo caso los embriones se producen sobre callos procedentes de fragmentos de hojas y subcultivados dentro de condiciones que no favorecen un crecimiento rápido. Los embrioides se multiplican luego por un fenómeno de embriogénesis adventicia sin aporte de sustancias de crecimiento. Estas condiciones serán más favorables a la producción de plantones « conformes ». Esta forma de producción se desarrolló y se aplicó a más de 200 árboles de 20 a 25 años de edad seleccionados por sus cualidades agronómicas en el laboratorio de La Mé, en Côte d'Ivoire. Todos los árboles usados dieron callos, y un 40 p. 100 de los mismos proporcionó embriones somáticos al cabo de 1 año de cultivo *in vitro*. Los rendimientos son más altos en el caso de utilizarse individuos más jóvenes, de 7 a 9 años de edad (dando embrioides un 70 p. 100 al cabo de 4 meses de cultivo). De 1983 a 1986, se sembraron 44 clones en 38 hectáreas. Las siembras 1983 a 1984 muestran un 100 p. 100 de individuos de características normales, particularmente por lo que respecta a racimos; la producción se está analizando.

In vitro vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.).

Strategy and results (1)

Y. DUVAL (2), T. DURAND GASSELIN (3), K. KONAN (3) and C. PANNETIER (4*)

INTRODUCTION

The biological characteristics of the oil palm rule out the use of certain common *in vitro* culture techniques which have generally been developed on dicotyledons, such as meristem culture or microcuttings. Hence all researchers who have successfully carried out *in vitro* vegetative propagation on the oil palm have used the process of somatic embryogenesis on calluses [Jones, 1974; Rabechault and Martin, 1976; Paranjothy and Othman, 1982; Nwanko and Krikorian, 1983].

It is generally accepted that using dedifferentiated tissue involves fairly significant risks of variability between the plantlets obtained and the mother-plant. Given the lack of alternative in the choice of technique used, the risks involved in this method have always been a cause of concern for researchers working on oil palm vegetative propagation. [Smith and Jones, 1970; Noiret, 1981]. After the first plantlets were obtained, field trials showed encouraging results [Corley *et al.*, 1977] despite the appearance of plants with growth rate and leaf morphology abnormalities [Corley *et al.*, 1981]. More recently, abnormalities in the reproductive organs and the frequency of their appearance have been connected with the duration of *in vitro* culture at certain stages [Corley *et al.*, 1986].

The IRHO researchers took these deviation risks into account as soon as the first clonal plantlets were obtained [Rabechault and Martin, 1976]. This led to significant modification of the process which had enabled production of the first plantlets [Pannetier *et al.*, 1981] and to the elaboration of a strategy concentrating on the *in vitro* culture method and the setting up of field trials.

A research structure has been set up by the IRHO. It comprises the team of ORSTOM/IRHO researchers working in the Plant Physiology laboratory (ORSTOM, Bondy, France) and in an experimental unit (La Mé Station in Côte d'Ivoire since 1981) and a team of geneticists and breeders working in France and overseas.

Research is carried out by the team of ORSTOM/IRHO researchers in close collaboration with the specialized laboratories of universities, the CNRS (5), the INRA (5) and the CIRAD (5).

The purpose of the experimental laboratory at the La Mé Station is to create clones and produce plantlets for field trials. This research programme involves studying methodology improvements and testing the process on a pilot scale.

Finally, the team of geneticists and breeders is studying the theoretical and practical aspects of using *in vitro* culture for the improvement of oil palm and the distribution of clonal material.

I. — METHODOLOGY

The research programme on *in vitro* vegetative propagation of the oil palm carried out by the IRHO includes the selection of ortets, basic research on the *in vitro* procedure and a set of clone tests.

This paper will only cover questions concerning *in vitro* culture and clone testing. The selection of trees to be cloned and the

consequences of vegetative propagation for the improvement programme have been dealt with in several publications [Noiret, 1981; Baudouin *et al.*, 1987; Meunier *et al.*, 1987].

In vitro methodology.

The only method currently known for vegetative propagation of the oil palm is through somatic embryogenesis on calluses [Blake, 1983]. Methodological differences concerning the choice of explant and the type of callus used have been reported and different culturing conditions can probably lead to positive results.

As the aim is to produce large quantities of true-to-type plants, the potentialities of mass propagation and the risks of somaclonal variations have to be taken into account.

From a theoretical point of view, it is known that the method used is likely to induce somaclonal variations [Reisch, 1983], which may have different causes (culturing of dedifferentiated tissues, use of synthetic auxins, duration of *in vitro* culture, etc.).

The method which led to the first clonal plantlets being obtained by Rabechault and Martin [1976] required the use of highly dedifferentiated tissue with a high growth rate (doubling every 10-20 days), known as a fast growing culture (FGC). Somatic embryos were then obtained from this tissue.

The use of FGCs gave rise to the following characteristics :

- they were obtained after the extended subculturing of primary calluses from leaf explants,

- the frequency of FGC appearance was low and these tissues seemed to come from a small number of primary callus cells,

- culture amplification (for mass propagation of plantlets) had to be carried out through the multiplication of tissues at the FGC stage and on media rich in chlorinated auxins.

These characteristics were judged unsuitable for obtaining true-to-type plantlets. Studies were undertaken with the following main objectives :

- obtainment of neoformations on primary calluses,
- culture amplification through the multiplication of these neoformations,

- reduction (rate-duration) in the use of phytohormones.

A new process was therefore developed [Pannetier *et al.*, 1981]. Somatic embryos are obtained from a small number of embryogenic structures appearing on the calluses obtained from fragments of young leaves cultured *in vitro* with 2,4-D.

Mass production is subsequently ensured by the occurrence of a secondary embryogenesis phenomenon, making it possible to establish strains of proliferating embryoids.

This secondary embryogenesis phenomenon, which has not been perfectly explained from a biological point of view, has the following characteristics :

- it occurs without any additional external growth regulator,
- the time over which it occurs can be unlimited ; strains of proliferating embryoids have been cultured for the last seven years at the Bondy laboratory, with no modification in behaviour or appearance,

- it enables mass production of *in vitro* material, giving rise to exponential growth of the embryoid strains and simultaneous production of shoots through the development of the oldest embryoids.

This process makes it possible to establish clone banks containing strains of proliferating embryoids which can be managed relatively easily for ensuring production on a commercial scale. Moreover, the results obtained through cryopreservation techniques [Engelmann *et al.*, 1985] enable the storage of embryoid strains for long periods by arresting all cellular activity, thereby excluding any risk of variation.

This method of direct embryogenesis on primary calluses provides a better guarantee that clonal material will be true-to-type and homogeneous for the following reasons :

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

(2) IRHO-CIRAD, plant physiology Laboratory, S. S. C. of ORSTOM, 70-74 Route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

(3) IRHO-CIRAD, La Mé Station, B.P. 13, Bingerville (Côte d'Ivoire).

(4) IRHO-CIRAD, plant physiology Laboratory, S. S. C. of ORSTOM, 70-74 Route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

* Person to whom all requests for reprints should be addressed.

(5) CNRS (Centre national de la Recherche Scientifique) ; INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) ; CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement).

— a maximum attempt is made to reduce the duration of the callus phase and the calluses are cultured under conditions which limit their growth,

— tissue multiplication is carried out on embryoid cultures, hence on more organized structures than calluses, without the addition of phytohormones,

— when it is essential to add auxins to the culture media (explants, calluses), their concentration has been reduced to a minimum; they have been totally eliminated for those stages where they are not indispensable.

Clonal trials.

The purpose of carrying out clonal trials is to make sure that the material produced is true-to-type and to find the best clones. As any significant modification to the *in vitro* propagation process necessitates new trials, the IRHO awaited the results of research on the process before undertaking any large-scale plantlet production.

The material produced is checked :

1) by planting in trials the first plantlets obtained from each clone, to see rapidly whether the embryoid strains are true-to-type and ;

2) by repeating every years the planting of a sample of clones, to ascertain whether the embryoid cultures are stable over time.

A series of tests is also necessary to determine the effect of cryopreservation on the behaviour of the plantlets produced from embryoid cultures preserved in liquid nitrogen.

Most of these trials are carried out as comparative trials; they are planted in a balanced lattice or random block statistical design with 6 replications. The elementary plot has 16 trees, so as to have 4 internal trees available, for which the effects of competition between clones are eliminated. A single density is used for the time being, 143 trees/ha, but it is planned to undertake density trials with the most interesting clones with reduced bulkiness.

A control clone and control crosses are systematically used. The control crosses are those from which the ortets of the clones tested were chosen.

Certain trials are repeated under different ecological conditions, so as to detect any genotype \times environment interactions and semi-commercial plantations of 5 to 25 ha per clone are planted to study the cultivation problems posed by this new planting material.

In addition, the reaction of the clones to Wilt is tested at the prenursery stage like sexually produced material and the most tolerant clones will be planted in a highly infested zone [Renard *et al.*, 1972].

Finally, mitochondrial activity measurements were begun not long ago on all the clones, using roots taken from plantlets 6 months old. The aim is to use the results from these biochemical measurements to sort out the most promising clones, as is already done with crosses [Kouamé and Noiret, 1981].

II. — PROGRAMME AND RESULTS

The development of the ORSTOM/IRHO oil palm vegetative propagation procedure led to an experimental laboratory being installed at the La Mé Station in Côte d'Ivoire.

This 350 m² unit employs 17 people, enables, the annual cloning of 40 trees and has a production capacity of 150,000 clonal plantlets per year.

The laboratory programme is partly the research of methodological improvements, partly the production of plantlets necessary for the trials and, finally, the creation of an embryoid strain bank, which will make it possible to move straight on to commercial production, once the field trials have confirmed the value of the method.

Since this unit was opened in 1981, 198 oil palms aged from 20 to 25 years have been sampled; they were selected for their agronomical qualities and belong to 30 different crosses.

Performance of the procedure.

The procedure used has made it possible to obtain calluses on all the oil palms sampled. The variability observed during the callogenesis phase was partly due to the genetic origin of the trees used (Fig. 1). Under the same culturing conditions, callus/explant yield was 25 to 30 p. 100 on average for crosses of Déli \times La Mé (DE \times LM) origin and from 5 to 10 p. 100 for crosses of Déli \times Yangambi (DE \times YA) origin. High variability has been observed within a cross of the same type (from a few p. 100 to 80 p. 100

for trees of DE \times LM origin), without it being possible to formally identify the main causes of this phenomenon.

In addition, great heterogeneity has been noted in the appearance of neoformations, with a high rate of root-like structures for crosses of DE \times YA origin.

Embryogenesis on primary calluses has been tested on 188 clones and embryogenic formations were observed in 137 cases. The frequency of somatic embryo appearance was linked to callus culture duration under « embryogenic » conditions (Fig. 2). In the case of oil palms aged from 20 to 25 years, 44 p. 100 of the clones gave neoformations after 12 months of callus culture, 75 p. 100 after 24 months and almost 100 p. 100 could be reached after 40 months of culturing. However, taking into account the risks of *in vitro* variability induction, it is unsuitable, in theory, to keep undifferentiated tissues for long periods on phytohormone media. Recent results obtained on thirty or so trees in a laboratory using the same procedure have shown that considerable improvement could be obtained by using oil palms aged from 9 to 10 years.

In this case, the success rate was 70 p. 100 after 4 months' incubation under « embryogenic » conditions.

Likewise, four oil palms from the nursery, which were cloned in 1979 by Pannetier *et al.* [1981], all gave rise to embryogenesis after three to four months' callus culture.

These results can be compared to the classic results observed on other perennial plants showing that the success of *in vitro* vegetative propagation is directly linked to the age of the mother-plants [Bajaj, 1984].

As the shortness of the time undifferentiated tissues are cultured is favourable to true-to-type multiplication, it can be considered that the use of young palms is a positive factor.

Mass production is ensured by obtaining and maintaining the secondary embryogenesis phenomenon. The initial work carried out on proliferating embryoid strains has shown that the use of phytohormones was not necessary at this stage. This feature was considered favourable for obtaining true-to-type plantlets and culture media development work concentrated on most of the constituents, except for phytohormones, the use of which was systematically excluded. In 1984, after three years of activity, 5 p. 100 of embryogenic clones were producing embryoids making it possible to obtain proliferating strains. Significant improvements have been achieved and better knowledge of the material, along with increased embryoid culture know-how enabled the La Mé laboratory to produce strains from 36 different clones representing 27 p. 100 of the embryogenic clones. Given the evolution of results (Table I), it is probable that these figures will be improved over the coming months.

Clonal plantlet production.

The proliferating embryoid strains enable plantlet production, which is carried out in two successive stages. Spontaneous rooting only occurs rarely and leads to an inadequate root system for transfer to natural conditions. Firstly, leaf development is favoured, to provide 5 to 7 cm shoots within four to six months, then a rooting treatment is applied. This offers two advantages: it makes it possible to produce a strong root system with a high success rate (80 %) and it allows synchronization of plantlet production for transfer to the prenursery.

The La Mé laboratory produced more than 137,000 plantlets belonging to 59 different clones between 1983 and 1986 (Table II). The increase in production resulted both from the number of clones available and from improvement of the secondary embryogenesis phenomenon in 1985-1986 (Table I).

If production distribution is considered per clone, 22 clones have produced more than 1,000 clonal plantlets, of which 3 have produced more than 10,000 plantlets. This roughly corresponds to proliferating embryoid strains available at the end of 1985 and this number should reach 36 in 1987.

The 24 clones which have produced less than 100 clonal plantlets had not yet enabled the production of proliferating embryoid strains at the end of 1986. In this case, structures with embryogenesis potential have formed on the calluses and a few somatic embryos have been produced, but the secondary embryogenesis phenomenon cannot be maintained and clonal plantlet production therefore remains low.

Field trials at the La Mé Station.

From 1983 to 1986, 44 clones were planted in comparative trials and 24 new clones will be planted in 1987. With the exception of the three clones planted in 1983, which came from plants at the nursery stage cloned at Bondy (France) all the clones have been produced at the La Mé laboratory from adult trees. In all cases,

the method used involves embryogenesis on primary calluses ; the shoots were rooted less than a year after embryogenesis.

All the male and female inflorescences observed for the plantings undertaken between 1983 and 1985 are normal (Table III). For the 1983 and 1984 plantings, production analyses are under way, but are still too incomplete to be exploited. In all cases the vegetative appearance is perfectly normal.

In addition, two clones produced by embryogenesis on FGCs were planted at La Mé in 1984 and 1985 (Table IV). The first, which was planted in 1984, produced abnormal male and female inflorescences, similar to those observed on the clones produced by Unifield T.C. [Corley, 1986].

On female inflorescences staminodia are seen to develop into fleshy parts, accompanied by abortion and parthenocarpic development of the fruit. On male inflorescences, there is also abnormal development of the stamens into fleshy parts.

Moreover, it seems that this floral abnormality is accompanied by vegetative anomalies visible in young plants [Ollagnier, *personal communication*].

The uniformity of the 208 palms planted shows that these abnormalities do not arise from a chance event, but that the method used, involving highly differentiated tissues cultured for a long time on auxin rich media, can be incriminated.

Another clone obtained from embryogenesis on FGCs in the presence of anti auxins and planted in 1985, reveals the same abnormality of the male inflorescences ; the plantlets are still too young to enable observation of female inflorescences. At the same time, plantlets produced by direct embryogenesis on primary calluses of the same palm have revealed normal male flowering.

It would therefore seem that the FGC phenomenon is to blame in the occurrence of abnormalities.

Multi site and semi-commercial trials.

Since 1986, a multi-site trial has been under way on seven different locations in Asia, South America and Africa, so that the performance of the clones can be studied under different environmental conditions. Nineteen clones will be delivered between 1986 and 1987 at the prenursery stage for carrying out these trials.

Furthermore, clonal material has been or will be supplied to all plantation companies wishing to set up semi-commercial trials in 5 to 25 ha plots, to study the performance of plantlets obtained from *in vitro* culture over large surface areas and to study the agricultural practices appropriate for this type of material.

III. — CONCLUSION AND PROSPECTS

The work undertaken over the last 15 or so years in France and then in Côte d'Ivoire has made it possible to master a procedure for the vegetative propagation of the oil palm.

Improvements in methodology obtained at all stages, particularly on the obtainment of proliferating embryoid strains, have enabled the production of more than a thousand plantlets for the 22 different clones and of more than ten thousand for 3 clones, which clearly show the possibilities offered by the method.

If the creation of an embryoid strain bank for embryoids from thirty-six different clones is added to these results, it is now possible to consider the commercial development of the process, with the *in vitro* methodology no longer a limiting factor in the extension of this technology.

The initial results obtained in the field trials are, for their part, very encouraging : none of the oil palms produced from direct embryogenesis on calluses show any anomalies. On the other hand, the plantlets produced by embryogenesis on FGCs have all revealed a floral morphogenesis abnormality identical to that observed by other teams using a different procedure.

It would seem reasonable to think that the abnormality in the reproduction system indicated by Corley [1986] and which was also found on the La Mé plantlets obtained from FGCs, results from a disorder that can be induced by several different factors and that appears over and above other anomalies.

In our case, it is the use of FGCs that is placed in doubt, whereas, according to Corley [1986], the duration of *in vitro* culture would seem to be at the origin of this disorder.

If it is taken that the factor responsible for this phenomenon is one of the first to be brought into effect by the inadequate use of *in vitro* culture, it can be thought that a method producing clonal plantlets with normal floral morphogenesis, would guarantee all the other characters and should ensure true-to-type plantlet production.

These hypotheses will be checked against the results obtained from field trials currently under way.

As regards the amount of time spent in *in vitro* culture, observations were carried out at La Mé on plantlets produced less than a year after embryogenesis on calluses and, on this precise point, there is only information currently available for one strain of embryoids. This strain supplied the plantlets used in Côte d'Ivoire in 1983 and in Indonesia and Cameroon in 1985 two and a half years later. The inflorescences are normal in all these cases, but there is only information for a small number of palms. The systematic planting of the same clones over several years is under way and the appearance of the first inflorescences will make it possible to confirm these results.

At this stage, it could be that the abnormalities observed may be linked to a known methodological cause — the use of fast growing cultures (FGCs), a method which is no longer used by the IRHO for the production of oil palm clones. No information that is currently available casts doubt on the vegetative propagation method adopted and developed following clearly defined theoretical choices.

Nous prions nos abonnés de bien vouloir noter que leurs règlements doivent être désormais établis :

We ask our subscribers to note that their payment should now be made as follows :
Rogamos a nuestros suscriptores que en adelante se sirvan pagarnos bien sea :

- par chèque à notre ordre (*by cheque made out in our name - por cheque, a nuestra orden*),
 - ou par virement au compte : (*or by transfer to our account - o por transferencia a la cuenta del*),
- IRHO-OLÉAGINEUX — Banque Nationale de Paris — Agence Kléber — 51, Av. Kléber, 75116 Paris (France).
RIB : 30004 - 00892 - 00000430596 - clé 21.

MAIS NE DOIVENT PLUS ÊTRE ENVOYÉS AUX CHÈQUES POSTAUX
PAYMENT SHOULD NO LONGER BE SENT TO POSTAL CHEQUES

Y LES ACLARAMOS QUE YA NO DEBEN ENVIARSE A LOS CHEQUES POSTALES

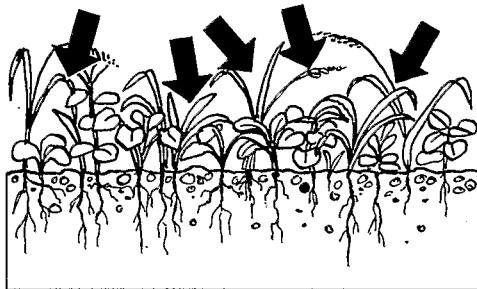
Paris N° 22965 44Z



Rationaliser le désherbage dans les plantations avec Gardopat®

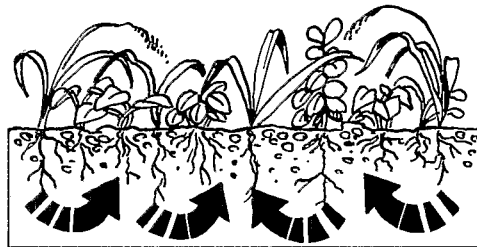
l'herbicide à double effet:

1. Effet initial



Gardopat agit rapidement sur les parties visibles des mauvaises herbes

2. Effet rémanent



Gardopat pénètre dans le sol et élimine les mauvaises herbes par les racines ou lors de la germination

Réduire les coûts de main-d'œuvre

Au lieu d'effectuer jusqu'à 4 binages ou pulvérisations avec un herbicide de contact sans effet rémanent, il suffit d'effectuer 2 traitements au Gardopat par an.*

Avec des coûts de main-d'œuvre plus bas et moins de surveillance, les plantations restent constamment propres, ce qui permet un travail plus efficace et une meilleure productivité.

* L'idéal est de traiter lorsque les mauvaises herbes ont 10 à 20 cm de haut.
Volume de pulvérisation: min. 200 litres/ha; si les mauvaises herbes sont plus hautes, augmenter le volume.



Désherbage aux moindres coûts de main-d'œuvre et récolte rationnelle grâce à Gardopat