

Multiplication clonale du palmier à huile par embryogenèse somatique (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Programmes de recherche liés au transfert d'échelle

Alain Rival, Frédérique Aberlenc-Bertossi, Thierry Beulé,
Fabienne Morcillo, Frédérique Richaud, James Tregear,
Jean-Luc Verdeil, Tristan Durand-Gasselien, Eugène K. Konan,
Yves Duval, Brou Kouame

La micropropagation clonale du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par embryogenèse somatique a été obtenue par diverses équipes de recherche à travers le monde [1-3]. Les protocoles de multiplication végétative *in vitro* ainsi établis ont conduit à la production de plusieurs millions de vitroplants clonaux à ce jour. Les avantages théoriques de cette stratégie pour les programmes d'amélioration variétale [4, 5] ont été validés par l'étude du comportement au champ des régénérants sur plus de 2 500 ha de plantations clonales [6, 7]. Ce changement d'échelle, opéré à partir du début des années 80, a mis en évidence plusieurs facteurs qui limitent encore aujourd'hui le développement commercial de ce procédé de micropropagation. Ces contraintes ont suscité des programmes de recherche fondamentale dans les domaines de la physiologie de la plante et de la semence, ainsi que de la biologie moléculaire. Le but du présent article est de présenter les différentes

étapes franchies par le groupe ORSTOM/CIRAD/IDEFOR et ses partenaires dans les pays producteurs, lors du développement à l'échelle pilote d'un protocole de micropropagation du palmier à huile par embryogenèse somatique.

Mise en place d'un procédé de production

Le clonage du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) est réalisé par embryogenèse somatique sur des cals d'origine foliaire, à l'aide du protocole décrit précédemment [2, 6]. La callogenèse est obtenue à l'obscurité (27 °C) sur un premier milieu de culture contenant du 2,4-D (*photo 1A*). Après 12 à 20 semaines, les cals sont isolés et transférés sur un nouveau milieu appauvri en auxines. Les formations embryogènes se développent à la surface des cals après un délai de culture variable (*photo 1B*). Elles sont ensuite isolées et transférées sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance. Dans les cas favorables, une embryogenèse adventive se met en place et conduit à une prolifération indéfinie des cultures d'embryons (*photo 1C*). On obtient donc des cultures polyembryoniques stabilisées, dans lesquelles des embryons somatiques les plus âgés se développent en pousses feuillées, qui sont isolées manuellement et transférées sur un milieu d'enracinement. Ce milieu, enrichi en auxines per-

met un enracinement *in vitro* des pousses feuillées en 8 semaines environ (*photo 1D*). Les plantules obtenues sont ensuite sevrées sous tunnel d'acclimatation durant 1 mois, puis transférées en pré-pépinière. Elles subissent alors les mêmes traitements que les plantules issues de semis (*photo 1E*).

Les transferts de technologie à partir du laboratoire de recherche vers les unités de production à l'échelle pilote ont commencé en 1982. Un laboratoire, conçu pour une capacité de production annuelle de 250 000 vitroplants annuels a été construit à l'IDEFOR-DPO (Côte d'Ivoire). En 1985-1986, deux autres laboratoires fondés sur le même modèle ont été ouverts en Indonésie, chez des partenaires du secteur privé (SOCFINDO) et public (IOPRI, Indonesian Oil Palm Research Institute). Simultanément, une unité semblable était installée en Malaisie, en collaboration avec une agence nationale de développement (FELDA, Federal Land Development Authority). Une filiale de droit privé du CIRAD a été créée (Tropiclone SA) en 1987 et un laboratoire de production construit en France, dans les environs de Montpellier.

Évaluation du procédé pilote en Côte d'Ivoire

Depuis 1981, les chercheurs de l'IDEFOR-DPO (Institut des Forêts, Département

A. Rival, F. Aberlenc-Bertossi, T. Beulé, F. Morcillo, F. Richaud, J. Tregear, J.-L. Verdeil, Y. Duval : CIRAD-CP/ORSTOM, Laboratoire GeneTrop, Unité de génétique et amélioration des plantes, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 01, France.
T. Durand-Gasselien, E.K. Konan, B. Kouame : IDEFOR/DPO, Station principale de La Mé, 13 BP 989 Abidjan, Côte d'Ivoire.

Tirés à part : A. Rival



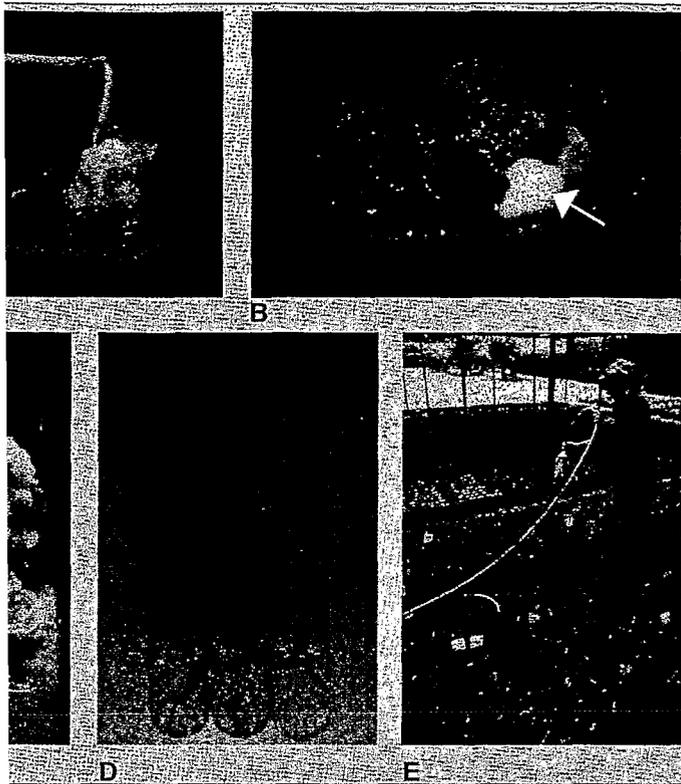


Figure 2A : Phases tardives du procédé de micropropagation du palmier à huile. **A** : Explant foliaire de palmier à huile. **B** : Embryogenèse somatique *in vitro* sur explant foliaire de palmier à huile. **C** : Multiplication d'embryons somatiques *in vitro* sur milieu auxinique. **D** : Enracinement *in vitro* sur milieu auxinique. **E** : Pépinière de palmiers à huile au Nord-Sumatra (Indonésie). Plantation SOCFINDO.

Figure 2A : Late phases of the oil palm micropropagation process. **A** : Oil palm leaf explant. **B** : *In vitro* somatic embryogenesis on oil palm leaf explant. **C** : Multiplication of somatic embryos through adventitious embryogenesis. **D** : *In vitro* rooting on auxinic medium. **E** : Prenursery of clonal oil palms in North Sumatra (Indonesia).

ces) conduisent des collaborations avec AD-CP, au sein du centre de régénération à l'échelle grâce à une plantation d'essais de 15 ans d'activité,

ce laboratoire de l'IDEFOR-DPO a acquis une somme considérable de données sur les performances du procédé [6-8]. Depuis l'ouverture du laboratoire, 496 palmiers ont été clonés, appartenant à diverses origines génétiques, incluant des individus *pisifera*, des rétrocroisements [*Elaeis guineensis* × (*Elaeis guineensis* × *Elaeis oleifera*)] et des individus clonaux. Tous les palmiers

prélevés ont fourni des cals sur explants foliaires en suivant le procédé de micropropagation standard. Le taux de callogenèse diffère en fonction de l'origine génétique de la plante mère. En outre, pour un croisement donné, les taux de callogenèse varient considérablement, avec des coefficients de variation compris entre 20 et 175 %. Sur l'ensemble des palmiers clonés, 82 % ont présenté au moins une fois une embryogenèse somatique effective. Ce phénomène est extrêmement lent (jusqu'à 2 ans) et demeure difficile à maîtriser. L'ensemble des résultats obtenus au cours des diverses étapes du procédé est présenté dans le tableau. À ce jour, le laboratoire a produit plus de 750 000 plants à partir de 216 clones (photo 2A). La surface totale plantée en clones en Côte d'Ivoire (essais génétiques + plantations commerciales) atteint 800 hectares.

Sur les 22 clones plantés en essais en Côte d'Ivoire, 16 présentent des rendements en huile à l'hectare supérieurs au matériel témoin issu de reproduction sexuée (L2T × D10D), avec des gains de productivité de 10 à 54 %. En outre, 15 clones produits par les laboratoires SOCFINDO, IOPRI et ORSTOM ont montré des rendements supérieurs de 8 à 44 % à ceux du témoin. La mise en évidence au champ de clones à très haut potentiel confirme les prévisions théoriques réalisées par les sélectionneurs [4, 5] sur l'intérêt de multiplier végétativement les individus d'élite sélectionnés dans les tests de descendance. Toutefois, le changement d'échelle effectué dans les différentes unités pilotes a mis en évidence divers obstacles à la diffusion commerciale du protocole.

Facteurs limitants

Le changement d'échelle effectué au cours des années 80-90, en collaboration avec différents partenaires et sur des lieux de

Phases tardives du procédé de micropropagation du palmier à huile

Sevrage**			Pré-pépinière***			Pépinière***			Taux globaux (%)	
Initial	Final	%	Initial	Final	%	Initial	Final	%	Pré-pépinière/ pépinière	Sevrage/ pépinière
660 562	550 956	83	152 041	120 669	79	113 157	88 381	78	62	51

Période : 1981-1995 ; *** Période : 1986-1995.

the late phases of the oil palm micropropagation process

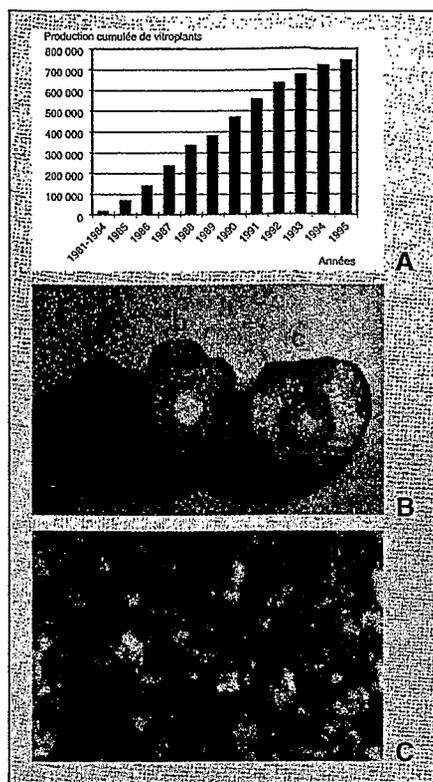


Photo 2. A : Production cumulée de vitroplants de palmiers à huile au laboratoire IDEFOR-DPO de La Mé (Côte d'Ivoire). **B :** Variations somaclonale *mantled* sur fruits de palmiers à huile. a : anormal grave ; b : anormal léger ; c : normal. **C :** Production d'embryons somatiques isolés à partir de suspensions embryogènes de palmiers à huile.

Photo 2. A : Cumulated production of oil palm vitroplants in the IDEFOR/DPO laboratory in La Mé (Côte d'Ivoire). **B :** « Mantled » somaclonal variation on oil palm fruits : a : severely abnormal ; b : slightly abnormal ; c : normal. **C :** Production of single somatic embryos from embryogenic suspensions of oil palms.

production différents, a révélé partout les mêmes contraintes. Les principaux facteurs limitants ont été identifiés dans deux domaines majeurs : les coûts de production et la conformité génétique des régénérants.

Coûts de production

Les protocoles de culture *in vitro* sont, d'une manière générale, extrêmement lents chez les palmacées, chaque étape nécessitant des délais bien supérieurs à ceux observés chez d'autres espèces. Ces caractéristiques ont été également décrites chez le cocotier (*Cocos nucifera* L.) [9]. En moyenne,

18 mois sont nécessaires entre le prélèvement du plant mère et la sortie *ex-agar* des premiers lots de production de plantules [6]. Ces caractéristiques ont un impact négatif sur les coûts de production, en augmentant le taux d'occupation des infrastructures et donc les frais fixes. En outre, le procédé dans son ensemble reste exigeant en main-d'œuvre, car plusieurs étapes font appel à des opérations manuelles extrêmement délicates (sélection et isollements des cals, choix des structures embryogènes compétentes, séparation des pousses feuillées avant induction racinaire, etc.). Ces coûts de production élevés ne permettent pas d'abaisser le prix de vente des vitroplants en deçà de sept fois le prix des semences hybrides améliorées (soit 3 à 5 US \$ par plant). En outre, le protocole de régénération en cours aujourd'hui ne permet pas une production à grande échelle, c'est-à-dire de l'ordre de 10^4 à 10^5 plants par clone et par an. Très peu de clones peuvent actuellement offrir une production annuelle de l'ordre de 10^4 plants. Pour un clone donné, la gestion des cultures et la stratégie de production déterminent à elles seules la disponibilité en vitroplants pour l'acheteur. Par conséquent, la demande doit s'adapter aux contraintes de la production, ce qui n'est évidemment pas acceptable d'un point de vue commercial.

Conformité des régénérants

Les essais clonaux ont révélé la présence de palmiers variants, avec une fréquence moyenne de 5 %, dans les populations de régénérants [6]. Ces variants présentent une anomalie du développement floral, initialement appelée « *mantled* » [10]. Elle se caractérise par une féminisation des pièces florales mâles chez les fleurs des deux sexes. Deux des verticilles internes sont modifiés, et leur développement conduit à une altération de la morphogénèse des fruits qui montrent alors des carpelles surnuméraires en lieu et place des étamines vestigiales entourant normalement la drupe. Le fruit prend alors un aspect mantelé (*mantled* en anglais) (photo 2B). La gravité du phénomène est variable ; elle peut n'avoir qu'une faible incidence sur la production d'huile si elle n'empêche pas la nouaison (c'est le cas pour l'anomalie « légère »), mais elle conduit à un avortement partiel ou total dans les cas d'anomalie « grave ». La détection précoce des variants somaclonaux de type *mantled* revêt donc une importance considérable pour le développement commercial du procédé de régénération.

Programmes de recherche en cours

Suspensions embryogènes

Des progrès considérables ont été réalisés récemment dans le domaine de la production de plants par embryogenèse somatique, grâce au développement de systèmes fondés sur le concept de « semences artificielles » [11]. Le phénomène d'embryogenèse somatique est alors employé pour la production à grande échelle d'embryons individualisés qui présentent un développement relativement synchrone. Le développement des embryons peut être stoppé à un stade donné, soit en suivant la procédure naturelle d'entrée en quiescence (telle qu'on la rencontre chez l'embryon zygotique), soit en usant de méthodes artificielles, telles que le stockage à basse température. Les embryons somatiques, qui sont le plus souvent encapsulés dans un gel nutritif/antifongique, sont par la suite utilisés comme de semences classiques et semés *in vitro* ou directement en sol [12].

Des suspensions embryogènes de palmier à huile ont été obtenues et décrites par plusieurs auteurs [13, 14] dans le but de développer des systèmes de micropropagation à grande échelle qui soient potentiellement automatisables [15]. À ce jour, des suspensions embryogènes ont été isolées pour plus de 20 clones. La concentration en structures embryogènes est de l'ordre de 10^5 par litre, avec un taux de multiplication moyen de 4 par mois de culture, ce qui permet d'envisager leur utilisation pour la micropropagation à grande échelle du palmier à huile (photo 2C). Par ailleurs [16], la multiplication des suspensions embryogènes en bioréacteur expérimental est possible. Les premiers palmiers produits par suspensions embryogènes sont aujourd'hui en cours d'évaluation au champ en Côte d'Ivoire. Les plantules issues d'embryons somatiques isolés sont généralement moins vigoureuses que celles issues de la germination de l'embryon zygotique dans la graine. Ce relatif manque de vigueur peut être la conséquence d'une maturation incomplète des embryons somatiques *in vitro* [17]. Les protéines de réserve de l'embryon zygotique constituent des marqueurs d'intérêt pour l'évaluation du degré de maturité et donc d'aptitude à la dessiccation des embryons somatiques [18]. Chez le palmier à huile, nos recherches ont pour but la compréhension des phénomènes régissant l'accumulation des protéines de réserve dans

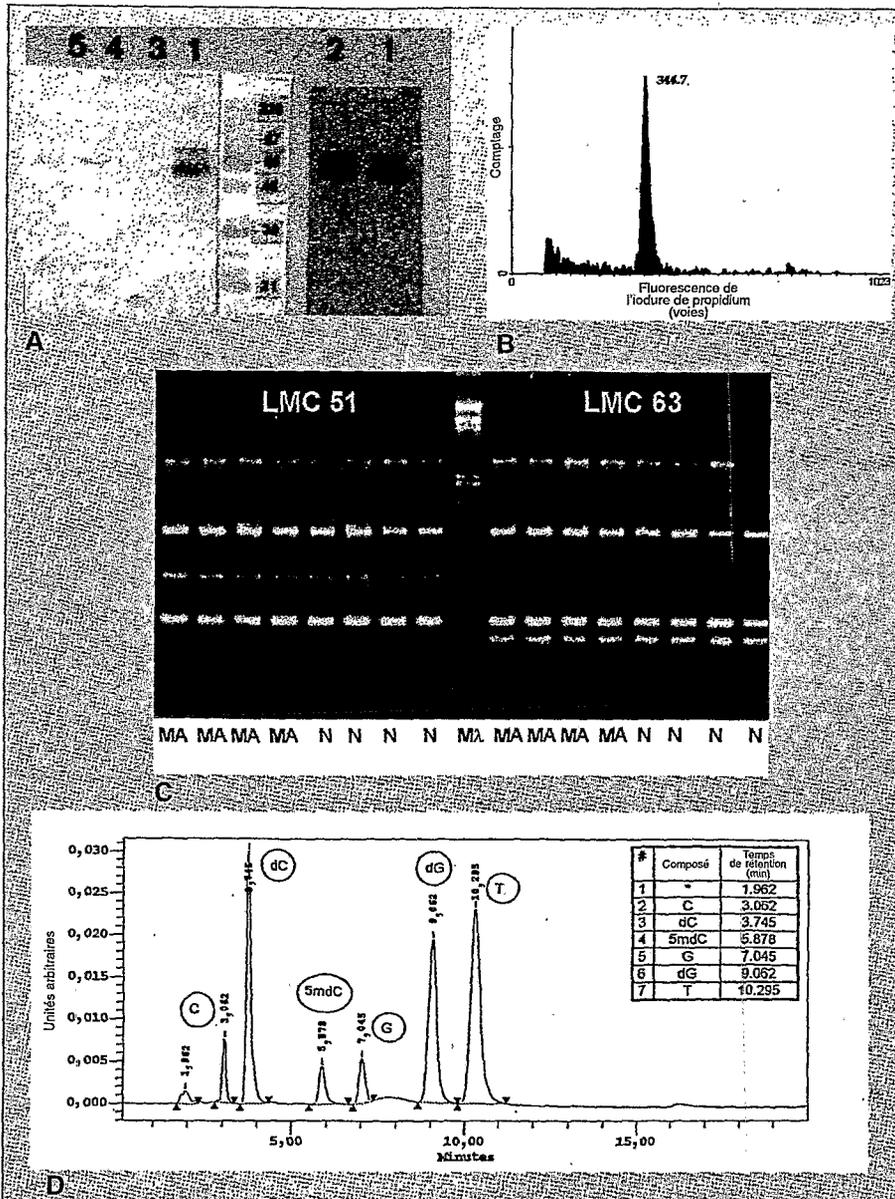


Photo 3. A : Immunoempreintes des protéines de réserves majoritaires dans les embryons zygotiques et somatiques de palmiers à huile réalisées à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre les globulines 7S. Pistes 1 : globulines purifiées de l'embryon zygotique ; 2 : extrait enzymatique brut de l'embryon zygotique ; 3 : albumines purifiées de l'embryon zygotique ; 4 : extrait enzymatique brut de la plantule ; 5 : extrait enzymatique brut de l'embryon somatique. **B :** Histogramme des intensités de fluorescence obtenues sur des noyaux isolés de cals nodulaires compacts de palmiers à huile, après coloration à l'iodure de propidium. **C :** Profils RAPD obtenus sur ADN génomique de régénérants normaux (N) et *mantled* (MA) issus de deux clones (LMC 51 et LMC 63). Amorçe OPJ04. **D :** Chromatogramme HPLC des nucléosides après hydrolyse enzymatique de l'ADN génomique des feuilles.

Photo 3. A : Immunoblots of the major storage proteins in oil palm zygotic and somatic embryos (polyclonal antibody raised against oil palm 7S globulin). Lanes 1 : purified globulins from zygotic embryos. 2 : crude protein extract from zygotic embryos. 3 : purified albumins from zygotic embryos. 4 : crude protein extract from plantlets. 5 : crude protein extract from somatic embryos. **B :** Histogram of fluorescence intensities in oil palm nuclei isolated from nodular compact calli and stained with propidium iodide. **C :** RAPD profiles obtained with genomic DNA from normal (N) and « mantled » (MA) regenerants from two different oil palm clones LMC 51 and LMC 63). Primer OPJ04. **D :** HPLC chromatogram of nucleosides resulting from enzymatic hydrolysis of leaf genomic DNA.

le but d'améliorer la vigueur des plants régénérés à partir des suspensions embryogènes précédemment décrites, et de pouvoir réaliser une conservation à moyen terme des embryons à température ambiante, sous forme de semences artificielles encapsulées [19] ou par cryoconservation [20, 21]. Les recherches récentes effectuées dans notre groupe [22] ont montré que les globulines de type 7S (qui sont les protéines de réserve majeures) peuvent être utilisées comme marqueurs de la maturation chez les embryons zygotiques de palmier à huile (photo 3A).

Par ailleurs, les oligosaccharides ont été également impliqués dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation chez les embryons [23]. Ces composés (raffinose et stachyose) jouent un rôle très important dans la création d'un état vitreux du contenu cellulaire au cours de la dessiccation ; ils assurent ainsi la protection de la structure cellulaire contre la cristallisation des solutés. Le rapport [saccharose/(raffinose + stachyose)] peut être donc considéré comme un indicateur fiable de la capacité des embryons à supporter une dessiccation partielle. Chez les embryons zygotiques de palmier, ce rapport décroît brutalement, de 68 à 14, entre le 3^e et le 4^e mois après fécondation, et il chute jusqu'à 5,2 au 6^e mois [24, 25]. Chez les embryons somatiques, la résistance à la dessiccation a pu être améliorée à l'aide de traitements *in vitro* à l'ABA (acide abscissique) et au saccharose, appliqués en fin de phase de maturation.

Physiologie du vitroplant

Les pertes subies lors de l'acclimatation des vitroplants ont une influence directe sur les coûts de production, car elles interviennent en fin de procédé, lorsque le plant a déjà acquis une valeur importante. Un programme de recherche visant à connaître le statut physiologique du matériel régénéré et son évolution lors du sevrage a été initié dans notre équipe [26-29]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une activité photosynthétique se manifestant très précocement au cours du développement *in vitro* du plant. Les pertes au sevrage devraient donc être attribuées plutôt à des problèmes de gestion des cultures (qualité de l'enracinement, degré de développement des plants destinés à l'acclimatation) qu'à la qualité intrinsèque du matériel produit.

Les phénomènes physiologiques contrôlant l'enracinement *in vitro* chez le palmier à huile ont été étudiés [30]. Le suivi de l'activité peroxydase totale au cours des phases d'induction/expression a permis de

fixer les conditions de culture permettant des taux d'enracinement satisfaisants (85-95 %) pour l'ensemble des clones produits.

Conformité génétique

Marqueurs biochimiques de l'anomalie *mantled*

Plusieurs marqueurs biochimiques potentiels destinés à la détection précoce de l'anomalie *mantled* dans les cals ou les vitroplants ont été évalués. Ainsi, nous avons procédé à la recherche de marqueurs protéiques dans les cals de prolifération [31], par analyse des profils électrophorétiques des différents types de cals. En outre, la teneur en régulateurs de croissance endogènes (cytokinines) a été évaluée en relation avec la variation somaclonale [32]. Cependant, il a été extrêmement difficile de tester la validité de ces marqueurs à grande échelle, en raison soit du manque de répétabilité (dans le cas des marqueurs protéiques), soit du coût très élevé (dans le cas des cytokinines endogènes) des techniques développées.

Plusieurs approches moléculaires sont aujourd'hui suivies pour l'étude de la variation somaclonale chez le palmier à huile. Elles concernent pour partie l'étude de la structure de l'ADN génomique en relation avec l'anomalie florale, à l'aide des techniques de cytométrie en flux et d'analyse RAPD, RFLP et AFLP. L'expression différentielle du génome chez les régénérants normaux et variants est étudiée, en collaboration avec l'Institut de biotechnologie des plantes d'Orsay, en suivant une approche ddRT-PCR. Le but de ces travaux est à la fois de comprendre les mécanismes moléculaires régissant les variations somaclonales et, à moyen terme, de mettre à disposition des unités de production un outil de détection précoce, permettant d'éliminer les variants en amont de la plantation.

Contrôle du taux de ploïdie

L'analyse par cytométrie en flux (*photo 3B*) montre que les cals embryogènes et les plants (issus de semis ou de micropropagation *in vitro*) présentaient le même niveau de ploïdie [33]. Trois types de cals embryogènes d'origine foliaire ont été analysés : cals nodulaires compacts (régénérant des palmiers normaux à 95 %), cals à croissance rapide (régénérant des palmiers anormaux à 98 %) et cals friables (à l'origine des suspensions embryogènes). Les cals à croissance rapide, à l'origine de palmiers variants, ne présentent pas de différence dans leur niveau de ploïdie. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une origine épigénétique de la variation somaclonale chez le palmier à huile.

Analyse RAPD

Les analyses par marqueurs RAPD, effectuées sur l'ADN génomique des régénérants normaux/anormaux, si elle a permis d'identifier un polymorphisme interclonal, n'a cependant pas mis en évidence de différence liée à l'anomalie *mantled* ni au procédé de micropropagation dans son ensemble [34]. L'absence de polymorphisme lié à la variation somaclonale, après l'examen de près de 8 900 bandes, indique une fréquence extrêmement faible de polymorphisme chez les régénérants (*figure 3C*), fréquence inférieure à celle obtenue (0,05 % : 3 cas de polymorphisme pour 5 607 bandes analysées) pour 120 régénérants de betterave [35]. Au cours de notre étude, mettant en jeu plus de 380 amorces arbitraires sur 64 échantillons différents, on peut approximativement estimer à 0,04 % la fraction du génome analysée. On peut dès lors s'interroger sur la capacité de l'approche RAPD à détecter des variations génétiques infimes pouvant se produire au cours des protocoles de régénération.

Méthylation de l'ADN génomique

Le rôle de la méthylation de l'ADN génomique dans la régulation de l'expression du génome [36] et son implication dans le déterminisme de la variation somaclonale [37, 38] ont fait l'objet de nombreux travaux. Des modifications significatives du degré de méthylation de l'ADN génomique au cours de la dédifférenciation [39] et de l'embryogenèse somatique [40] ont été montrées chez les plantes supérieures. Il est donc possible que des modifications dans le taux ou la répartition de la méthylation de l'ADN génomique puissent être impliquées dans le déterminisme de la variation somaclonale chez le palmier à huile, comme on a pu le montrer chez le maïs [41].

Chez le palmier à huile, le taux de méthylation globale a été estimé dans notre groupe après l'hydrolyse enzymatique de l'ADN génomique en nucléosides (*photo 3D*), leur séparation par chromatographie et la quantification de la 5-méthyl-cytidine [42, 43]. Le taux de méthylation globale [(5mdC)/(5mdC + dC)] estimé chez les palmiers adultes, dans le but de comparer têtes de clones/régénérants et régénérants normaux/anormaux du même clone, est d'environ 25 %, ce qui correspond au niveau moyen décrit chez d'autres végétaux supérieurs [44]. La mesure du taux de méthylation globale est en cours, dans le but de discriminer les palmiers régénérants normaux et *mantled* à l'âge adulte. Cette approche sera poursuivie dans des études sur le rôle des régulateurs de croissance (appli-

qués au cours du protocole de régénération *in vitro*) sur la méthylation globale du génome [40].

Perspectives de recherche

Suspensions embryogènes

Les recherches de notre groupe s'intéressent à l'application du concept de « semences artificielles » au palmier à huile, dans le but de réduire les coûts de production et d'améliorer la gestion, la conservation et la diffusion du matériel clonal issu de suspensions embryogènes.

Nos premiers résultats ont montré qu'à l'issue de son développement *in vitro*, l'embryon somatique issu de suspension embryogène ne présente pas les caractéristiques physiologiques de l'embryon zygotique mature. Il importe donc d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'accumulation des réserves et d'acquisition de la résistance à la dessiccation au cours du développement *in vitro*, en prenant l'embryon zygotique dans la graine comme modèle d'étude. Les travaux en cours portent sur l'apport d'osmoticum (PEG, saccharose) et de régulateurs de croissance (ABA) destinés à améliorer la tolérance des embryons à la dessiccation. L'impact de ces traitements sur les paramètres tels que la teneur en protéines de réserve (globuline 7S) et oligosaccharides ainsi que le rôle de l'apport d'acides aminés majeurs (considérés comme précurseurs potentiels de la biosynthèse de ces protéines, tels que l'arginine ou la glutamine) sont en cours d'étude.

Marqueurs moléculaires de l'anomalie *mantled*

Les études sur le polymorphisme de l'ADN génomique en relation avec l'anomalie seront poursuivies en abordant une étude par marqueurs AFLP [45], qui sont susceptibles de générer un polymorphisme plus important que les marqueurs RAPD précédemment employés.

Par ailleurs, les observations au champ conduites à la Station IDEFOR-DPO de La Mé (RCI) ont permis de montrer le caractère instable dans le temps de l'anomalie *mantled* [8]. En effet, près de 50 % des palmiers gravement atteints présentent une réversion vers le phénotype normal après 7 ans au champ. Cette observation constitue un argument supplémentaire en faveur

d'un déterminisme épigénétique de l'anomalie florale, susceptible d'affecter l'expression du génome au jeune âge.

Nos études sur la méthylation de l'ADN génomique se poursuivent, en utilisant des marqueurs RFLP. Ces études mettent en jeu des enzymes de restriction isoschizomères (*MspI/HpaII*), couplées à l'emploi de sondes génomiques récemment isolées chez le palmier à huile. Ces enzymes de restriction présentent des sensibilités différentes à la méthylation des dC, et sont donc susceptibles de générer des profils de restriction différents en fonction du taux de méthylation de l'échantillon. Ces données viendront compléter l'approche quantitative du phénomène réalisée par estimation du taux de méthylation globale.

Nous développons depuis peu, en collaboration avec l'IBP (Prs C. Hartmann & A. Rode), une approche nouvelle pour l'étude des variants somaclonaux, fondée sur l'analyse différentielle de l'expression du génome chez les régénérants normaux/anormaux, en utilisant des techniques récentes mises au point pour l'étude de l'abondance relative de populations spécifiques d'ARNm entre deux populations. Cette méthode, appelée ddRT-PCR (*differential display Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction*) [46], caractérise l'expression des gènes dans des populations de cals et d'embryons somatiques.

Conclusion

Le groupe ORSTOM-CIRAD/IDEFOR aujourd'hui (CNRA) se situe au centre d'un réseau de collaborations cohérent, reliant divers partenaires issus de la recherche académique en France (Universités et Instituts de Recherche) aux principaux acteurs de la filière « palmier à huile » dans les pays producteurs (sociétés privées, agences de développement, Instituts de recherche agronomique nationaux). Ce réseau, à l'interface entre recherche et développement, permet de répondre aux attentes de la filière en développant des approches novatrices, fondées sur des outils de recherche modernes. La mise en place d'un contrôle de qualité fiable à l'aide de marqueurs moléculaires permettra à la micropropagation clonale du palmier à huile d'évoluer vers une exploitation commerciale durable. Cette stratégie fera appel à des techniques de micropropagation à hauts rendements de multiplication et à faible coût d'exploitation, telles que l'utilisation à grande échelle des suspensions embryogènes ■

Remerciements

Les travaux décrits dans le présent article ont été réalisés dans le cadre d'un programme associant le CIRAD-CP (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement - Département cultures pérennes), l'ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération) et l'IDEFOR-DPO (Institut des forêts - Département des plantes oléagineuses, Côte d'Ivoire). Les auteurs remercient chaleureusement l'ensemble du personnel de la Station IDEFOR-DPO de La Mé pour l'excellente qualité de leur collaboration.

Références

- Corley RHV, Barrett JN, Jones LH. Vegetative propagation of oil palm *via* tissue culture. *Oil Palm News* 1977 ; 22 : 2-8.
- Pannetier C, Arthuis P, Liévoix D. Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oléagineux* 1981 ; 36 : 119-22.
- Paranjthy K. Oil Palm. In : Ammirato PV, Evans DE, Sharp WR, Yamada Y, eds. *Handbook of plant cell culture, crop species*. New York : Macmillan, 1984 ; 3 : 591-605.
- Soh AC. Expected yield increase with selected palm clones from current D x P seedlings materials and its implications on clonal propagation, breeding and ortet selection. *Oléagineux* 1986 ; 41 : 51-6.
- Meunier J, Baudouin L, Nouy B, Noiret JM. Estimation de la valeur des clones de palmier à huile. *Oléagineux* 1988 ; 46 : 347-59.
- Duval Y, Engelmann F, Durand-Gasselín T. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In : Bajaj YPS, ed. *Somatic embryogenesis and synthetic seed I, biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin : Springer Verlag, 1995 ; 30 : 335-52.
- Duval Y, Amblard P, Rival A, Konan E, Gogor S, Durand-Gasselín T. Progress in oil palm tissue culture and clonal performance in Indonesia and the Côte d'Ivoire. In : *Conference proceedings, international planters*. Kuala Lumpur, Inc. Soc. Planters, 1997 ; 1 : 291-307.
- Konan EK, Durand-Gasselín T, Duval Y, Kouamé B. Anomalie de la morphogénèse florale « anomalie *mantled* » observée chez les plants de Palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) obtenus par embryogénèse somatique. Étude de la réversion vers un phénotype normal des plants non conformes. In : *Séminaire Biotechnologies Végétales*. Dakar : AUPELF-UREF, 1996 : 26-46.
- Verdeil JL, Buffard-Morel J. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). In : Bajaj YPS, ed. *Somatic embryogenesis and synthetic seed I, biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin : Springer-Verlag, 1995 ; 30 : 299-317.
- Corley RHV, Lee CH, Law LH, Wong CY. Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter* 1986 ; 62 : 233-40.
- Redenbaugh K. Introduction. In : Redenbaugh K, ed. *Synseeds : applications of synthetic seeds to crop improvement*. London : CRC Press, 1993 : 3-7.
- Fujii J, Slade D, Aguirre-Rascon J, Redenbaugh K. Field planting of alfalfa artificial seed. *In vitro Cell Dev Biol* 1992 ; 28P : 73-83.
- De Touchet B, Duval Y, Pannetier C. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Rep* 1991 ; 10 : 529-32.
- Teixeira JB, Sondahl MR, Kirby EG. Establishment of embryogenic cell suspensions of oil palm and regeneration. In : *Vllth International congress on plant tissue and cell culture*. Abstracts. Amsterdam, June 24-29, 1990 : 137.
- Bajaj YPS. *Biotechnology in agriculture and forestry, high tech and micropropagation I*. Berlin, Heidelberg, New York : Springer, 1991 ; vol 17.
- Sondahl M. Tissue culture of cacao, coffee and oil palm. In : *Proceedings of the fourth conference int. plant biotechnology network*. San José, Costa Rica, 1991 ; 98-9.
- Crouch ML. Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta* 1982 ; 156 : 520-4.
- Redenbaugh K, Paasch BD, Nichol JW, Kossler ME, Viss PR, Walker KA. Somatic seeds : encapsulation of asexual plant embryos. *Bio/Tech* 1986 ; 4 : 781-97.
- McKersie BD, van Acker S, Lai FM. Role of maturation and desiccation of somatic embryos in the production of dry artificial seeds. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry, somatic embryogenesis*. Berlin : Springer-Verlag, 1995 ; 30 : 152-67.
- Engelmann F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica* 1991 ; 57 : 227-43.
- Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N, Duval Y. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports* 1993 ; 12 : 352-5.
- Morcillo F, Bertossi-Aberlenc F, Trouslot P, Duval Y. Characterization of 2S and 7S storage proteins in embryos of oil palm. *Plant Science* 1997 ; 122 : 141-51.
- LePrince O, Hendry GAF, McKersie BD. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 1993 ; 3 : 231-46.
- Aberlenc-Bertossi F, Morcillo F, Rival A, Duval Y. Oligosaccharides and dehydrin-like proteins during oil palm embryo development. In : *Fifth International Workshop on Seeds*. University of Reading (UK), 1995, abstract.
- Chabrillange N, Aberlenc-Bertossi F, Engelmann F, Duval Y. Effect of oligosaccharide content during maturation on tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm zygotic embryos. In : *Proc Symposium « Analytical techniques in low temperature biology »*. University of Abertay, Dundee, Scotland, 1996. Poster.
- Rival A, Nato A, Laverne D, Duval Y. Carboxylases (PEPc and RUBISCO) activities during *in vitro* development and acclimatization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In : *Proc VIIIth International congress of plant tissue and cell culture, IAPTC*. Firenze, 1994 ; abstract n° S20-13 : 261.
- Rival A, Beulé T, Nato A, Laverne D. Immunoenzymatic study of RubisCO in oil palm and coconut. *Plantations, Research, Development* 1996 ; 3 : 55-61.

28. Rival A, Beulé T, Lavergne D, Nato A, Havaux M, Puard M. Development of photosynthetic characteristics in oil palm during *in vitro* micropropagation. *J Plant Physiol* 1997 ; 150 : 11-26.
29. Rival A, Beulé T, Lavergne D, Nato A. Growth and carboxylase activities in *in vitro* micropropagated oil palm plantlets during acclimatization : comparison with conventionally germinated seedlings. *Advances in Hort Sci* 1998 ; 3 : 111-7.
30. Rival A, Bernard F, Mathieu Y. Changes in peroxidase activity during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Scientia Hort* 1997 ; 71 : 103-12.
31. Marmey P, Besse I, Verdeil JL. Mise en évidence d'un marqueur protéique différenciant deux types de cals issus de mêmes clones chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *C R Acad Sci Paris* 1991 ; 313 série III : 333-8.
32. Besse I, Verdeil JL, Duval Y, Sotta B, Maldiney R, Miginiac E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity : endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. *J Exp Bot* 1992 ; 43 : 983-9.
33. Rival A, Beulé T, Barre P, Hamon S, Duval Y, Noirot M. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Rep* 1997 ; 16 : 884-7.
34. Rival A, Bertrand L, Beulé T, Trouslot P, Lashermes P. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breeding* 1998 ; 117 : 73-6.
35. Munthali MT, Newbury HJ, Ford-Lloyd BV. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. *Plant Cell Rep* 1996 ; 15 : 474-8.
36. Finnegan EJ, Brettell RIS, Dennis ES. The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. In : Jost JP, Saluz HP, eds. *DNA methylation* : molecular biology and biological significance. Basel, Switzerland : Birkhäuser Verlag, 218-61.

37. Brown PTH. DNA methylation in plants and its role in tissue culture. *Genome* 1989 ; 31 : 717-29.
38. Karp A. On the current understanding of somaclonal variation in : Mifflin BJ, ed. *Oxford surveys of plant molecular and cellular biology*. Oxford : 1991 ; 7 : 1-58.
39. Durante M, Geri C, Ciomei M. DNA methylation in dedifferentiating plant pith tissue. *Experientia* 1982 ; 38 : 451-2.
40. Loschiavo F, Pitto L, Giuliano G, et al. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 1989 ; 77 : 325-31.
41. Kaeppeler SM, Phillips RL. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 90 : 8773-6.
42. Palmgren G, Mattsson O, Okkels FT. Employment of hydrolytic enzymes in the study of the level of DNA methylation. *Biochim Biophys Acta* 1990 ; 1049 : 293-7.
43. Gehrke CW, McCune RA, Gama-Sosa M, Ehrlich M, Kuo KC. Quantitative reverse-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA. *J Chrom* 1984 ; 301 : 199-219.
44. Klaas M, Amasino RM. DNA methylation is reduced in DNase-I sensitive regions of plant chromatin. *Plant Physiol* 1989 ; 91 : 451-4.
45. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995 ; 23 : 4407-14.
46. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992 ; 257 : 967-71.

Résumé Multiplication clonale du palmier à huile par embryogenèse somatique (*Elaeis guineensis* Jacq.)

A. RIVAL, ET AL.

La micropropagation clonale du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par embryogenèse somatique est réalisée depuis plus de 20 ans par le groupe ORSTOM, CIRAD et IDEFOR (France et Côte d'Ivoire). Les protocoles développés ont été validés par la plantation de plus de 2 500 ha de palmiers régénérants dans divers pays producteurs. Les principales difficultés rencontrées lors du transfert à grande échelle des protocoles concernent : les coûts de production, qui demeurent très élevés par rapport au prix de la semence améliorée (car le procédé en cours reste long, exigeant en main-d'œuvre et limité par des taux de prolifération relativement faibles) ; la présence de variants somaclonaux, avec une fréquence moyenne de l'ordre de 5 %, dans les populations de palmiers issues d'embryogenèse somatique, les individus les plus gravement atteints pouvant présenter une stérilité totale.

Ces limitations ont stimulé la mise en place de nouveaux programmes de recherche dans les domaines de la physiologie du vitroplant et de la semence, ainsi que de la biologie moléculaire. Les résultats illustrent l'importance du stade de pré-développement ainsi que des essais de comportement à grande échelle, dans les stratégies de transfert d'échelle, ce qui implique une approche fondamentale fondée sur des outils modernes de recherche.

Summary

Scaling-up in the cloning of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) through somatic embryogenesis

A. RIVAL, ET AL.

The results presented in this paper illustrate both the importance of the pilot step in the scaling-up strategy for the cloning of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and the capacity of this step to generate major fundamental research programmes using modern research tools.

1. Establishment and assessment of a pilot process. Cloning of oil palm is performed by somatic embryogenesis on calli of leaf origin (Photo 1A-E), using a previously described protocol [2, 6]. A programme was initiated in 1982 to promote technology transfer from research laboratories to pilot production units, which led to the opening of five pilot units in France, Côte d'Ivoire, Indonesia and Malaysia. The regeneration process was assessed on a large scale with regular planting of clonal material at the IDEFOR-DPO (Institut des Forêts, Département des Plantes Oléagineuses) Research Station in La Mé (Côte d'Ivoire), in collaboration with ORSTOM and CIRAD-CP.

After more than 15 years of activity, the IDEFOR-DPO laboratory has obtained a considerable amount of data on the performance of the process [2, 3] (Table) and on the behaviour of clonal palms in the field. To date, the total production of the La Mé laboratory since its opening in 1981 has reached 750,000 plant-

lets, derived from 216 different clones (Photo 2A). The overall area planted with clonal material (genetic trials + commercial plots) in Côte d'Ivoire has now reached 800 ha (thus ca 110,000 palms).

2. Bottlenecks in clonal plantlet production. Because of the very high production costs, the selling price of clonal plantlets could not be lowered to below 7-fold the price of selected seeds (3-5 US \$). Furthermore, field assessments revealed the a low percentage (ca 5%) of variant palms with abnormal flower development [6]. The early detection of "mantled-type" somaclonal variants is thus now a critical concern for oil palm clonal micropropagation.

Difficulties encountered when scaling up the ORSTOM-CIRAD oil palm micropropagation process prompted the launching of new research programmes.

3. Research programmes under way. Research was initiated in our group [6, 13] with the aim of developing new automation and scale-up methods for oil palm micropropagation, e.g. embryogenic suspensions (Photo 2C). We are now focusing our studies on patterns of storage protein accumulation in somatic embryos in order to improve the vigour of *in vitro* regenerated plants produced through embryogenic suspensions, and also with the aim of achieving medium-term conservation of embryos at room temperature as encapsulated artificial seeds, or alternatively by using cryopreservation.

Recent work in our group [22] has shown that 7S globulins, which are the major storage proteins in oil palm zygotic embryos, could serve as potential markers for the study of somatic embryogenesis (Photo 1E). The *in vitro* photosynthetic parameters of embryogenically-

derived plant material were measured throughout the process, with the aim of characterizing the physiological status of the micropropagated plants, thus optimizing success rates during acclimatization [26-29]. Moreover, studies on changes in peroxidase activity during *in vitro* rooting of oil palm clonal plantlets led to implementation of an efficient rooting protocol [30]. Recently, several molecular techniques were developed for studying somaclonal variation. Flow cytometric analysis (Photo 3B) revealed that embryogenic calli and plants had the same ploidy level [33]. RAPD markers (Photo 2B) were found to be efficient for distinguishing oil palm clonal lines, but failed to reveal any polymorphism associated with either "mantled" somaclonal variants or with the overall tissue culture process used to regenerate oil palms [34]. Overall genomic DNA levels, as estimated by HPLC analysis (Photo 2C) averaged 25% in oil palm, were in agreement with levels already observed in other plants.

We are now developing a novel approach based on the analysis of differential genome expression in normal/variant plant material using the PCR-based differential display method [46]. Patterns of DNA methylation during *in vitro* micropropagation in relation with "mantled" somaclonal variation are being studied using RFLP markers in conjunction with oil palm cDNA probes and isoschizomeric restriction enzyme pairs. The results show differential sensitivity to the methylation of dC residues (e.g. MspI/HpaII).

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 492-8.



d'études et de recherches francophones

Agricultures

Étude de
Les biotechnologies,
pour quoi faire ?
Didier Spire

Emmanuel Picard

Gérard Azoulay Sylvie Bonny

Georges Ducreux, et al. Michel Delseny

Ismail El Hadrami, et al. Robert Haïcour, et al. Erik Auboiron, et al. Serge Hamon, et al. Orlando Lopez-Baez, et al. Alain Rival, et al. Valérie Hocher, et al. Jean-Marie Kinet, et al. Miloudi Nachit, et al. Jeanne Zoundjihékon, et al. Florent Engelmann

Pratiques et estimation des risques
Anne-Marie Chèvre, et al. Lise Jouanin, et al. Claudine Franche, et al. Fabrice D. Pessel, et al. Éric Lainé, et al. André Charrier, et al.

Le maître et responsable de l'agriculture
Philippe Monneveux



Prix au numéro :
120 FF pays
du Nord
60 FF pays
du Sud

PM 267

Volume 7 Numéro 6 pages 423 à 574 Novembre-Décembre 1998

