

RAPPORT DE MISSION

CRA-PP Pobé au Bénin

du 3 au 12 mars 2008

CIRAD-BIOS UMR DIAPC Fabienne Morcillo

04-2008

CIRAD-DIST Unité bibliothèque Lavalette



Mission CRA-PP Pobé au Bénin

du 3 au 12 mars 2008

1 6 AVR. 2008

FABIENNE MORCILLO, CIRAD-BIOS, UMR DIAPC ET TIM TRANBARGER, IRD, UMR DIAPC

1/ Les objectifs de la mission

La mission a été réalisée au Centre de Recherches Agricoles Plantes Pérennes (CRA-PP) de Pobé. Cette station de l'Institut National de Recherches Agricoles du Bénin (INRAB) a pour mandat principal la conduite des activités de recherche et d'appui au développement pour le palmier à huile sous la direction de Monsieur Isaac ADJE.

Les objectifs de la mission étaient de :

- 1) Récolter du matériel végétal (fruits et inflorescences) pour analyses physiologiques, moléculaires et histologiques dans le cadre de trois projets de recherche développés en collaboration avec la station de Pobé, l'UPR 28 et l'équipe mixte Cirad-IRD « Palm development group »
- 2) Présenter les projets de recherche conduits par F. Morcillo et T. tranbarger sur le développement du fruit du palmier à huile
- 3) Former Hubert Domonhedo et le personnel du laboratoire d'analyse de l'huile de la station à la mesure de l'acidité de l'huile de palme.

2/ Contexte du projet de recherche « Mise en place et développement du fruit de palmier à huile »

Récemment, l'équipe mixte Cirad-IRD « Palm Development Group» dirigée par J. Tregear a initié de nouvelles recherches liées au développement et à la maturation du fruit de palmier à huile. Le fruit du palmier à huile est une drupe qui comporte une pulpe huileuse (mésocarpe), un noyau (endocarpe ou coque) et une amande également riche en lipides. Trois types variétaux du fruit existent à l'état naturel chez E. guineensis, selon la présence ou l'absence de cette coque qui est gouvernée par un gène majeur Sh. En fonction des allèles de ce gène, les fruits peuvent être de type dura (gros fruits à coque épaisse, sans fibre mésocarpique environnante), pisifera (petit fruit sans coque, femelle-stérile) ou tenera (coque intermédiaire, entourée de fibres mésocarpiques, et une pulpe abondante. C'est cette dernière variété qui est employée aujourd'hui dans les palmeraies. La diversité allélique qui gouverne cet aspect du fruit chez E. guineensis n'est pas présente chez l'espèce E. oleifera d'origine amazonienne De plus, les fruits d'E. oleifera présentent plusieurs divergences au niveau de leur développement et de leur composition biochimique par rapport à E. guineensis. Différents caractères clés sont concernés, notamment l'abscission des fruits, l'activité lipasique et la composition en acides gras. Tous ces caractères portent un intérêt agro-alimentaire et peuvent être exploités dans le cadre de programmes d'introgression de gènes d'E. oleifera vers le palmier à huile africain.

Les études développées dans l'équipe Cirad-IRD ont pour objectif la compréhension des bases cellulaires et moléculaires de plusieurs aspects du développement du fruit au sein du genre *Elaeis* tels que :

- Les événements de la morphogenèse précoce du fruit, avec un intérêt particulier porté au développement post-fécondation du carpelle et à la mise en place de la coque (JL Verdeil et N Billotte)
- L'abscission du fruit. Contrairement au cas d'*E. oleifera*, la chute des fruits est couramment observée chez le palmier à huile africain, avec une certaine variabilité liée à la diversité génétique. Ce caractère présente un intérêt agronomique car la non abscission permet de réduire les fréquences de récolte. Des études déjà réalisées sur *E. guineensis* ont montré que le processus d'abscission s'effectue en deux phases distinctes (Henderson and Osborne, 1990). Les premiers événements de la cinétique d'abscission peuvent être observées dès le stade de la fleur, avec la mise en place de zones cellulaires destinées à se différencier en zones d'abscission.
- L'activité lipasique du fruit (Ngando-Ebongue et al., 2006). Ce caractère, qui porte sur le rendement en huile, la fréquence de récolte et les délais entre la récolte et l'usinage, est également contrasté entre les deux espèces d'*Elaeis*. En effet, une activité lipasique significative est observée lorsque les fruits d'*E. guineensis* atteignent la maturité, ce phénomène n'étant pas observé chez *E. oleifera*.

Ces différents aspects du développement du fruit sont étudiés par des approches d'histocytologie classique, de microscopie/imagerie de pointe, de biologie moléculaire (recherche et caractérisation de gènes par similitude de séquence) et de génomique fonctionnelle (analyse du transcriptome). Plusieurs caractères du fruit faisant l'objet d'études génétiques et de programmes de sélection variétale, nos études fonctionnelles du développement du fruit sont réalisées en collaboration étroite avec l'UPR28 et ses partenaires tels que le CRA-PP de Pobé.

A l'heure actuelle, les études du fruit de palmier à huile, qui ont démarré en 2007 au sein de l'équipe « Palm Development Group», sont réalisées à l'aide de deux projets bénéficiant d'un financement extérieur. D'une part, un projet de réseau franco-thaï (géré par EGIDE) impliquant l'équipe mixte, l'UMR DAP (N. Billotte) et plusieurs acteurs en Thaïlande (Centre BIOTEC, Université Mahidol, Université Kasetsart, Université PSU) a démarré en 2007 pour une période de 2 ans. D'autre part, un financement RTRA a été obtenu pour l'accueil d'un thésard thaïlandais à mi-temps à Montpellier (projet coordonné par T. Tranbarger). En 2009, plusieurs demandes de financement seront envisagées, notamment dans le cadre de l'ANR Génomique.

Les résumés des programmes de recherche associées à l'abscission et l'activité lipasique sont présentées <u>en annexe 1</u>. Une présentation relative à ces deux projets de recherche a été donnée le lundi 10 mars au département Sélection de la station de Pobé.

3/ Programme de la mission

Le programme quotidien de la mission est décrit dans <u>l'annexe 2</u>. Le détail du matériel prélevé est donné dans <u>l'annexe 3</u>

3-1. Récolte de fruits à différents stades de développement

Des fruits ont été récoltés sur des régimes âgés de 10 à 180 JAP au sein de deux croisements E. guineensis issus des descendants de DA115D (<u>Figures 1 et 2</u>). Le premier croisement PO6851 (PO3360D AF) a été désigné comme matériel de référence guineensis en fonction de l'acidité présumée élevée de son huile et également pour son caractère d'abscission. Le second croisement, PO6925 (PO4907D AF), à quant a lui été choisi car issu de LM2531D AF identifié comme à faible activité lipase et à faible abscission.

Des fruits ont été aussi prélevés sur du matériel *oleifera* pour ces caractéristiques inverses en terme d'acidité et abscission. Le matériel d'origine Brésil initialement choisi n'étant pas disponible, nous avons prélevé des régimes au sein du matériel d'Amérique du Sud pour lequel les dates de fécondation n'étaient pas connues. Le stade de développement des régimes a été évalué en fonction de la couleur des fruits (Figure 3).

Enfin des fruits *mantled* ont été récoltés sur des clones *E. guineensis* (tenera). Un seul stade de développement a été prélevé en fonction de la faible disponibilité de ce type de régime observé au champ (Figure 4).

Au laboratoire d'analyses, rattaché au département « Sélection » de la station de Pobé, plusieurs prélèvements et mesures ont été réalisés sur des fruits non abîmés, encore attachés aux épillets récoltés dans la partie centrale du régime.

En détail en fonction de l'âge du régime et de son origine:

- le poids frais moyen des fruits a été défini à partir de 3 lots de 10 fruits, après élimination du pédoncule et des bractéoles ;
- la teneur en pulpe a été estimée à partir d'un lot de 30 fruits après pesée des fruits et des graines qu'ils contenaient ;
- le poids sec du mésocarpe prélevé sur une dizaine de fruits a été calculé après passage de une nuit à l'étuve à 103°C (Figure 5).
- des échantillons de mésocarpe ont été prélevés dans le but de quantifier la teneur en huile. Dans ce cas le mésocarpe a été placé dans un tube placé dans une boite hermétique remplie de silicagel pour favoriser sa déshydratation. Le silicagel a été changé régulièrement au cours du séjour pour maintenir les échantillons dans une atmosphère sèche.
- Des tissus du fruits ont été directement congelée (-80°C) en vue d'analyses moléculaires (en général 1 lot de 1 à 3g). Deux types de tissu ont été ainsi prélevés : le mésocarpe et les zones d'abscission à la base du fruit (<u>Figure 6</u>). L'ensemble des opérations a été réalisé dans les conditions les plus propres possibles afin d'éviter une dégradation éventuelle des transcrits (ARNm) contenus dans le matériel végétal.
- De la même manière les zones présumées d'abscission du fruit ainsi que du mésocarpe ont été fixés directement en vue d'analyses histologiques classiques. L'utilisation de la pompe à vide du laboratoire « pollen » a été utilisée pour faire le vide à plusieurs reprises pour favoriser la fixation des échantillons (Figure 7).



Figure 3: Prélèvement des fruits d'E oleifera d'Amerique du sud (stade I, II et III)



Figure 4: Fruits mantled

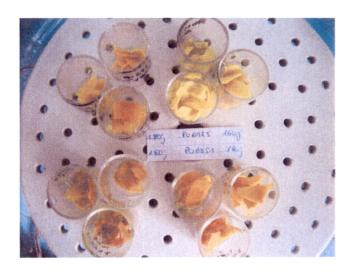


Figure 5: Prélèvement du mésocarpe des fruits pour évaluation de la masse sèche



Figure 6: Prélèvement de la zone d'abscission

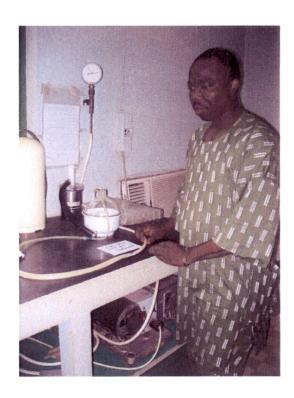


Figure 7: Action du vide pour favoriser la pénétration du fixateur dans les tissus prélevés (laboratoire « pollen »)

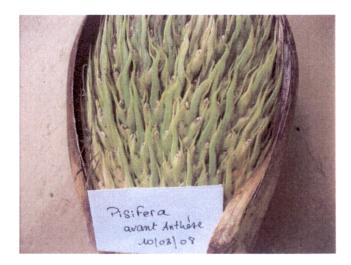


Figure 8: Inflorescence *pisifera* avant l'anthèse

Par ailleurs, du matériel a également été prélevé le 12/03/08 pour faire des analyses seulement possibles à Montpellier (<u>Annexe 3</u>). Une partie de ce matériel a été traitée à l'éthylène à Montpellier pour évaluer et mesurer l'abscission en fonction de l'origine et de l'age des fruits (<u>Annexe 5</u>). Une autre partie a été destinée à l'évaluation de la production d'éthylène émis par les fruits encore attachés à l'épillet. Enfin un dernier lot a été utilisé pour évaluer la masse fraîche, la masse sèche et la teneur en huile des fruits ainsi que l'acidité de l'huile, avant et après traitement à l'éthylène des fruits (analyse en cours).

3-2. Récolte d'inflorescences avant, pendant et après l'anthèse

Des inflorescences *dura* ont été prélevées avant l'anthèse, pendant et après anthèse (moins de une semaine sépare deux stades). Ce matériel a été repéré sur des arbres ne faisant pas partis de programme de sélection. De la même manière, des inflorescences *pisiféra* ont été prélevées avant l'anthèse et à l'anthèse (Figure 8). Le prélèvement de fleurs après l'anthèse n'a pas été possible car les fleurs sont coupées avant d'arriver jusqu'à ce stade pour favoriser le travail des agents dans la plantation. Pour une prochaine fois il faut faire la demande de ce matériel à l'avance pour prévenir suffisamment tôt les équipes qui travaillent dans les plantations *pisifera*.

Ce matériel a été demandé par N. Billotte et JL Verdeil dans le cadre du projet d'étude sur l'analyse histologique de la mise en place de la coque.

3.3. Mesure de l'acidité de l'huile

Suite à la formation reçue à Montpellier par G. Piombo (Cirad) et à l'envoie de matériels et produits chimiques à la station de Pobé, j'ai pu réaliser au cours de ce séjour quelques mesures d'acidité de l'huile au laboratoire d'analyse de Pobé. Ces mesures ont été réalisées avec Hubert Domonhedo (Figure 9). Elles ont été conduites sur divers échantillons d'huile préparés par David Cros et Hubert ainsi que sur des échantillons préparés au cours de la mission (fruits ages de 180 JAP issus des croisements PO6851 (arbre 425-15-15) et PO6925 (arbre 425-19-2). Dans ce cas le mésocarpe des fruits a été prélevé, environ 8 grammes, broyé, et mis à l'obscurité 1 heure puis transféré dans 80 ml d'hexane contenu dans une bouteille ambrée et stocké à 4°C. Le lendemain après agitation, la totalité du broyat et de l'hexane a été transféré dans un ballon additionné de 20 ml d'hexane ayant servi au rinçage de la bouteille. Apres chauffage, l'huile a été récupérée, pesée et transférée dans deux béchers indépendants à raison de 1 g d'huile / becher.

L'acidité de l'huile a alors été évaluée à l'aide d'une solution de potasse et un indicateur coloré (voir protocole Annexe 4).

Il a été remarqué au cours de cette visite qu'un produit chimique manquait pour évaluer la titration de la potasse. Ce produit, *potassium hydrogen phthalate*, a été depuis recommandé et pourra être amené à Pobé au cours d'une prochaine mission.

Par ailleurs Pobé devra commander de l'éthanol pur pour mener à bien ces mesures. Attention l'utilisation d'éthanol inférieur à 95° ne permet plus la miscibilité de l'hexane + éthanol et faussera les résultats.

Au cours de la mission, l'acidité de l'huile produite par les arbres 425-15-15 (PO6851) et 425-19-2 (PO6925) a été estimée respectivement à 48% et 17,5%. L'acidité de l'huile d'un troisième échantillon (FA5811AS de 414-20-2, LM19016=LM2531D AF) a été définie à

15%. Cet échantillon pourrait par la suite être utilisé comme control pour chaque série de mesure.

Les mesures relatives aux autres échantillons analysés au cours de cette mission (le 11 mars) ont été directement communiquées à David Cros.

4/ Visite de la station de Pobé et des plantations

Visite du laboratoire de gestion du pollen et visite des nouveaux bâtiments relatifs à la production de semences.

Visites en plantation des essais de sélection, des plantations de *Elaeis oleifera*, des back cross E. *guineensis* et E. *oleifera* et des essais clonaux. Observation de la diversité des phénotypes des régimes et des fruits. Observation des fruits dits « craquelés (Figure 10).

5/ Premiers résultats obtenus à partir du matériel prélevés

Les résultats sont présentés dans l'Annexe 5.

- 5-1. Masse fraîche des fruits et des graines en fonction de l'âge et de l'origine des fruits
- 5-2. Composition en pulpe des fruits en fonction de l'âge et de l'origine des fruits
- 5-3. Masse sèche du mésocarpe en fonction de l'âge et de l'origine des fruits
- 5-4. Production d'éthylène par les fruits attachés à leur épillet
- 5-5. Masse sèche du mésocarpe des fruits utilisés pour faire la mesure de production d'éthylene
- 5-6. Effet d'un traitement d'éthylène sur l'abscission des fruits

Les résultats 5.4 et 5.6 seront présentés dans un poster à Merida, au Mexique en juin 2008 (Annexe 6) en collaboration avec le CRA-PP de Pobé et l'UPR28 notamment.

Rq: les données relatives aux teneurs en huile n'ont pas pu être réalisées sur les échantillons prélevés sur place du fait de leur mauvaise qualité (apparition de moisissure). Une estimation des teneurs en huile pourra être réalisés sur le matériel ramené à Montpellier. Ces mesures pourraient aussi être réalisée par Pobé dans le futur.

6/ Conclusions

La mission m'a permis de re-visiter la station de Pobé: rencontre et échanges avec les différentes personnes sources; intérêt et spécificités de la culture du palmier à huile au Bénin (en références par exemple au déficit en eau; associations des cultures; marché de la semence et production de pollen...). J'ai pu noter une amélioration importante en terme de production et gestion des semences (visite des bâtiments en cours de construction lors de ma première visite à Pobé en 2004). Par ailleurs la station de Pobé représente aujourd'hui une

source considérable et riche de matériel végétal pour les études menées en collaboration avec Montpellier.

Le matériel prélevé au cours de cette mission, largement facilitée par David Cros et l'ensemble du personnel de la division Sélection, devrait nous permettre de mener à bien une partie de nos recherches en disposant de matériel végétal d'étude pour différents programmes (programmes essentiellement développés par T. Tranbarger et F. Morcillo (abscission ; lipase) mais aussi pour les programmes menés par N. Billotte et JL Verdeil (Certipalm).

Cependant d'autres matériels dans le futur seront nécessaires pour compléter les premières données accumulées. En particulier des fruits issus de clones (mantled et non mantled) mais aussi des fruits d'E. oléifera à des stades connus de développement (Annexe 7). Une demande complémentaire sera transmise dans le cadre de la continuité de ces projets de recherche menés en collaboration avec l'UPR28 et le CRA-PP de Pobé. Elle concernera la mise à disponibilité de régimes à différents stades de maturité de E. Oléifera. Ces stades de maturité seront définies à partir des informations transmises par Pobé (durée moyenne de maturité pour les E. Oleifera d'origine Brésil et/ou Amérique du Sud; détermination de l'âge moyen des régimes lors de l'observation du changement de couleur des fruits (passage à l'orange)).

Annexe 1: Résumés des programmes de recherche

RTRA 36 month PhD grant 2007 (120 K €)

PhD Candidate: Duangjai Sangsrakru

<u>Project Leader</u>: Timothy J. Tranbarger Palm Developmental Biology Group, UMR 1097 DIAPC <u>Project Title</u>: Molecular, developmental and genetic studies on the fruit abscission process of oil

palm (Elaeis guineensis Jacq.)

Project Summary

Fruit development and ripening are unique biological processes of flowering plants in addition to being essential for both human and animal diets. Oil palm (Elaeis guineensis Jacq) belongs to the Arecaceae family and is the number one source of edible vegetable oil worldwide. In addition, an increase in the use of palm oil as a source of biofuel is predicted to cause constraints on the worldwide supply of edible palm oil and increase the pressure for higher yields and/or cultivatable areas. One factor that limits overall yield gains is the loss due to non-synchronised ripening and subsequent shedding of the ripest fruit before harvest. Research with model plants (eg. Tomato) has shown that the process of fruit shedding is a highly coordinated developmental process that involves a functionally specialized layer of cells, referred to as the abscission zone (AZ). The specialization of the AZ that develops in the pedicel of the flower becomes apparent later during fruit development when a subpopulation of these cells functions to respond to signals originating from the ripening fruit. These signals are perceived and lead to AZ specific expression of a number of abscission related genes, some of which encode cell wall modifying enzymes that function to decrease the adhesion between cell walls of adjacent AZ cells. The activity of these enzymes on the cell walls of the AZ leads to adjacent cells being separated along the base of the fruit stalk and the fruit is shed. The current project has the dual objectives of working towards an understanding of oil palm fruit shedding at the molecular level and identifying gene markers that could be used to select for molecular assisted selection. The approaches include: (I) a molecular developmental characterization of the abscission zone cell biology from its differentiation during early flower formation to the cell separation stage during fruit ripening, (II) the construction of cDNA libraries and corresponding ESTs (Expressed Sequence Tags) corresponding to the differentiated AZ in the developing flower prior to fertilization and the AZ during abscission of the ripened fruit, and (III) the identification of potential genetic cDNA markers of interest identified in parts I and II as a basis for molecular assisted selection. The RTRA partners (UMR 1097 DIAPC, UMR 1098 DAP and UPR 28) supporting this PhD grant provide en excellent combination of expertise, experience, availability of molecular resources and genetic material for experimental studies that will allow advances in our understanding of a key agronomic character of oil palm.

Overview of Research Partners

| French RTRA Research Teams and Thai Partners | Staff | Position | Time dedicated 10% | |
|--|---|---|--------------------------|--|
| ¹ UMR 1097 DIAPC (IRD/CIRAD Palm Group) | TREGEAR James | DR2, HDR, (Group Leader), IRD | | |
| (IRD/CIRAD I and Group) | ² TRANBARGER, Timothy J. | PhD, Research Scientist CR1 IRD | 60% | |
| - | MORCILLO Fabienne, | Doctorat, Research Scientist CIRAD | 40% | |
| - | JOUANNIC Stefan | Doctorat, Research Scientist, CR2 IRD | | |
| * | COLLIN Myriam | DUT, Engineer assistant IRD | 20% | |
| UMR 1098 DAP (CIRAD Palm Genetics Group and Plant Cell Imagery Center) | Billotte Norbert Doctorat, Research Scientist CIRAD (Palm Genetics) | | | |
| | VERDEIL Jean-Luc | Doctorat, Research Director, HDR, CIRAD (Director Plant Imagery Center, PHIV) | 10% | |
| UPR 28 AGPH (CIRAD Oil Palm Breeding Group) | NOUY Bruno | Doctorat, Research Scientist CIRAD | 10% | |
| Genome Institute, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Bangkok Thailand | Tragoonrung Somvong | PhD, Director of Genome Institute, (Team Leader) | 20% | |
| 66 | Jantasuriyarat Chatchawan | 1976, PhD, Research Scientist | 20% | |
| 66 | ³ Sangsrakru Duangjai | Masters, Research Assistant and PhD candidate | 100% | |

¹Host Laboratory; ²Project Leader; ³PhD project candidate

Projet LiPALM

Le palmier à huile (E. guineensis) est la première source mondiale d'huile végétale. Avec un rendement annuel pouvant dépasser 7 tonnes par hectare par an et un faible coût de son huile, cette espèce représente la source potentielle de biodiesels la plus importante. Pour favoriser un usage de l'huile de palme en biodiesels, il faut maintenir des coûts de production faibles, améliorer la teneur en acide oléique et limiter la dégradation de l'huile dans les fruits matures. Une lipase endogène est responsable de cette dégradation au moment de la chute du fruit, ce qui oblige à des fréquences de récolte coûteuses en maind'œuvre. Notre projet a deux objectifs majeurs : (1) démarrer, dès 2011, une sélection et une production de matériel à faible activité lipase (2) identifier et cloner des gènes candidats pour préparer la sélection assistée par marqueurs d'un meilleur rendement en huile de palme avec un rapport oléique/palmitique élevé. La variabilité génétique de l'activité lipase sera analysée dans les principaux fonds génétiques sélectionnés et les origines sans activité lipase seront identifiées. L'ADNc du gène codant la lipase sera cloné. Son expression et sa fonction seront étudiées au cours de la maturation du fruit. Des banques normalisées de séquences ADNc de fruits à différents stades de maturation seront construites. Des analyses d'expression différenteille compareront les profils d'expression des gènes exprimés dans le mésocarpe dans différents fonds génétiques présentant des activités lipasiques variables. Les principaux gènes associés à l'activité lipase et aux étapes clés du métabolisme de l'huile de palme seront identifiés au cours de la maturation du fruit. Ces gènes, et le gène codant la lipase, seront cartographiés sur une descendance de grande valeur agronomique.

> CIRAD-DIST Unité bibliotheque Lavalette

Annexe 2 :

Programme journalier de la mission de F. Morcillo et T. Tranbarger

| Date | Matin | Après midi |
|-----------------|--|--|
| Lundi 3 mars | Départ de Montpellier | Accueil à Cotonou par David Cros et transport jusqu'à Pobé en fin de soirée |
| Mardi 4 mars | -Accueil par le directeur de la station - Visites à Mr Agassi (organisation du transport du matériel en fin de séjour) - Visite à Mr Alphonse Omoré à la sélection (discussion des objectifs de la mission) - Choix des arbres avec David Cros au sein du matériel E. guineensis DA115D et E. Oleifera. | - Repérage des arbres en vue des récoltes des régimes - Préparation du matériel de laboratoire nécessaire à la récolte et aux expérimentations - Planification des récoltes |
| Mercredi 5 mars | - Récolte de 6 régimes PO6851 et PO6925 (moins de 10 JAP, 30 et 90 JAP) - Egrappage des régimes et prélèvement de la pulpe et des zones d'abscission pour chacun des stades de développement pour mesure de poids sec, teneur en eau, fixation pour analyse histologique et cryocongelation pour analyse moléculaire | prélèvement de la pulpe et des zones d'abscission pour chacun des stades de développement. |
| Jeudi 6 mars | prélèvement de la pulpe et des zones d'abscission pour chacun des | prélèvement de la pulpe et des zones d'abscission pour chacun des stades de développement - broyage de la pulpe des fruits agés de 180 JAP pour extraction de l'huile puis mesure d'acidité. |
| Vendredi 7 mars | Récolte de 2 régimes PO6851 et PO6925 (100 et 120 JAP) Repérage d'inflorescence pisifera juste avant l'anthèse. | -Mesure d'acidité de l'huile sur les fruits de 180 jours récoltés la veille. |

| | - égrappage des régimes et prélèvement de la pulpe et des zones d'abscission pour chacun des stades de développement pour mesure de poids sec, teneur en eau, fixation pour analyse histologique et cryocongelation pour analyse moléculaire | |
|---------------|--|---|
| Samedi 8 mars | visite et observations des plantations de back cross visite et observations des plantations de clones visite des plantations d'hévéa, caféier, bananiers et cacaoyers | |
| Lundi 10 mars | Récolte d'1 régime mature Oleifera d'Amerique centrale reperage d'un arbre Oleifera avec des régimes à différents stades de développement. FA inconnu. Récolte d'inflorescences pisifera avant anthèse. Récolte inflorescence dura à l'anthèse (ne faisant pas partie des programmes de sélection). égrappage des régimes et prélèvement de la pulpe et des zones d'abscission pour chacun des stades de développement pour mesure de poids sec, teneur en eau, fixation pour analyse histologique et cryocongelation pour analyse moléculaire | - Présentation des travaux de recherche et de l'avancement de la mission aux personnels de la Sélection par F. Morcillo |
| Mardi 11 mars | Récolte de 3 régimes d'Oleifera d'amerique centrale Récolte de régimes mantled Récolte d'inflorescences pisifera à l'anthèse. égrappage des régimes et prélèvement de la pulpe et des zones d'abscission pour chacun des stades de développement pour mesure de poids sec, teneur en eau, fixation pour analyse histologique et cryocongelation pour analyse moléculaire | -Mesure d'acidité de l'huile sur les fruits de 180 jours récoltés par Hubert et David. |

| Mercredi 12 mars | - Départ pour Cotounou de la | | | |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| | bonbonne d'azote contenant le | - Départ pour Cotonou, puis | | |
| | matériel récolté (via transporteur | montpellier | | |
| | locaux + service FRET en France). | _ | | |
| | Organisation par Mr Agassi. | | | |
| | - Récolte du matériel pour | | | |
| | analyse à Montpellier (traitement | | | |
| | éthylene et mesure de production | | | |
| | d'éthylene) | | | |
| | - Récolte inflorescence dura | | | |
| | avant anthèse | | | |
| Jeudi 13 mars | - Traitement éthylene des | - Restitution du matériel « inflo » | | |
| | épillets | fixés pour analyses histologiques | | |
| | - Préparation du matériel pour la | à JL Verdeil (projet Certipalm) | | |
| | mesure de production d'éthylene | | | |
| Vendredi 14 mars | - Récupération bonbonne au | - Récolte du matériel traité à | | |
| | service Fret de l'aéroport de | l'éthylène | | |
| | Montpellier. | - Fixation du matériel pour | | |
| | - mesure de production | hybridation in situ ou | | |
| | d'éthylene à partir des épillets | immunologie | | |
| | enfermés hermétiquement pendant | | | |
| | 24h | | | |
| Samedi 15 mars | - Suite de la préparation matériel | | | |
| | pour hybridation in situ ou | | | |
| | immunologie | | | |
| Compte rendu de la | mission par F. Morcillo et T. Tranbar | rger à l'équipe et l'UPR 28 le jeudi | | |

27 mars

11

Annexe 3 : <u>Détail du matériel prélevé.</u>

| | numfa | g | eniteur | parcelle | ligne | arbre | datefa | 0 | rgen | | MERE | | | cg_po.ORIGINE |
|---|---------|----|---------|----------|-------|-------|------------|----|------|----|--------|----|--------|----------------------------|
| | AS 5681 | PO | 8815 D | 425 | 15 | 15 | 03-sept-07 | РО | 6851 | РО | 3360 D | РО | 3360 D | (DA 115 D af) |
| | AS 6474 | РО | 8807 D | 425 | 15 | 1 | 26-sept-07 | РО | 6851 | PO | 3360 D | РО | 3360 D | (DA 115 D af) |
| | AS 6842 | РО | 8251 D | 425 | 18 | 20 | 08-oct-07 | РО | 6851 | PO | 3360 D | РО | 3360 D | (DA 115 D af) |
| | AS 7629 | РО | 8807 D | 425 | 15 | 1 | 01-nov-07 | РО | 6851 | РО | 3360 D | РО | 3360 D | (DA 115 D af) |
| | AS 8141 | РО | 8251 D | 425 | 18 | 20 | 24-nov-07 | РО | 6851 | РО | 3360 D | РО | 3360 D | (DA 115 D af) |
| | AS 8746 | PO | 8245 D | 425 | 18 | 11 | 20-déc-07 | РО | 6851 | РО | 3360 D | РО | 3360 D | (DA 115 D af) |
| | AT 323 | РО | 8807 D | 425 | 15 | 1 | 31-janv-08 | РО | 6851 | PO | 3360 D | РО | 3360 D | (DA 115 D af) |
| | AT 1111 | РО | 8252 D | 425 | 18 | 21 | 03-mars-08 | РО | 6851 | PO | 3360 D | PO | 3360 D | (DA 115 D af) |
| | AS 5881 | PO | 8271 D | 425 | 19 | 26 | 08-sept-07 | РО | 6925 | PO | 4907 D | PO | 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| = | AS 6440 | PO | 8267 D | 425 | 19 | 18 | 24-sept-07 | РО | 6925 | PO | 4907 D | PO | 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| | AS 7443 | РО | 8267 D | 425 | 19 | 18 | 27-oct-07 | PO | 6925 | PO | 4907 D | PO | 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| | AS 7906 | PO | 8267 D | 425 | 19 | 18 | 12-nov-07 | PO | 6925 | РО | 4907 D | PO | 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| | AS 8081 | PO | 8272 D | 425 | 20 | 6 | 19-nov-07 | РО | 6925 | PO | 4907 D | PO | 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| | AS 8697 | PO | 8272 D | 425 | 20 | 6 | 16-déc-07 | PO | 6925 | PO | 4907 D | PO | 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| | AT 342 | PO | 8265 D | 425 | 19 | 16 | 02-févr-08 | РО | 6925 | РО | 4907 D | РО | 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| | AT 1039 | РО | 8265 D | 425 | 19 | 16 | 01-mars-08 | РО | 6925 | РО | 4907 D | PO | 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |

427 8 13

426 1 7

LMC90

plante 1988.

| numfa | geniteur | parcelle | ligna | arbre | datefa | áge | огдая | MERE | PERE | ORIGINE |
|--------|-----------|----------|-------|-------|-----------|-----|---------|-----------|-----------|----------------------------|
| S421AS | PO 8243 [| 425 | 18 | 2 | 03-nov-07 | 130 | PO 6851 | PO 3360 D | PO 3360 D | (DA 115 D af) |
| 7163AS | PO 8248 [| 425 | 18 | 14 | 20-oct-07 | 144 | PO 6851 | PO 3360 D | PO 3360 D | (DA 115 D af) |
| 6681AS | PO 8807 [| 425 | 15 | 1 | 02-oct-07 | 162 | PO 6851 | PO 3360 D | PO 3360 D | (DA 115 D af) |
| 7611AS | PO 8860 E | 425 | 20 | 19 | 01-nov-07 | 132 | PO 6925 | PO 4907 D | PO 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| 7409AS | PO 8257 [| 425 | 19 | 7 | 26-oct-07 | 138 | PO 6925 | PO 4907 D | PO 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| 7319AS | PO 8258 E | 425 | 19 | 8 | 21-oct-07 | 143 | PO 6925 | PO 4907 D | PO 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |
| 6708AS | PO 8257 [| 425 | 19 | 7 | 05-oct-07 | 159 | PO 6925 | PO 4907 D | PO 4907 D | (DA 115 D af) LM 2531 D AF |

récoltés le 12/03/2008

Annexe 4 : Protocole de mesure d'acidité de l'huile

Mars 2007. F. Morcillo. Pobé.

Mesure de l'acidité de l'huile de palme

Préparation des échantillons :

- Récupérer 5 fruits sur un régime mur (le jour de la récolte). Les fruits ne doivent pas être abîmés. Noter FA et la date de la récolte.
- Eliminer l'exocarpe (peau) de chaque fruit et découper ensuite des petits morceaux de mésocarpe avec un scalpel (environ 10 g)
- Placer les morceaux de mésocarpe dans un mortier et broyer finement.
- Transvaser le broyat dans une bouteille ambrée et placer à l'obscurité
- Apres exactement 1 heure, ajouter 80 ml d'hexane. Fermer la bouteille, vortexer une minute. Puis conserver une nuit (ou plus) à 4°C.
- Le lendemain vortexer à nouveau la bouteille. Filtrer le mélange (entonnoir en verre + boule à thé en fer), rincer la bouteille avec 20 ml d'hexane, filtrer à nouveau et rassembler l'ensemble du liquide obtenu dans un ballon. Evaporer l'hexane à l'aide du ballon chauffant.
- Lorsque tout l'hexane est évaporé, retirer le ballon et transvaser l'huile dans une petite bouteille tarée étiquetée. Placer la bouteille ouverte dans un dessiccateur pendant au moins 1 heure.
- Peser la quantité d'huile obtenue ; stocker à 4°C.

Dosage:

- Prélever exactement 1 gramme d'huile dans un bêcher étiqueté. Renouveler l'opération pour avoir deux échantillons identiques.

Rq1 : si nécessaire re-liquéfier l'huile en placent la bouteille à l'étuve quelques minutes pour faciliter le pipetage).

Rq2 : Si la quantité extraite d'huile est inférieure à 2 grammes bien noter la masse placer dans la bouteille.

- Verser à l'aide d'une éprouvette 40 ml d'un mélange hexane-Ethanol100° (ou 95°) (mélange 1+1 en volume). ATTENTION si Ethanol < 95°C l'hexane et l'éthanol ne sont plus miscibles.
- Ajouter quelques gouttes de Phénolphtaléine
- Titrer l'acidité avec une burette contenant une solution éthanolique 0,1N d'hydroxyde de potassium* (potasse = KOH) conservée dans une bouteille ambrée au plus 5 jours.
- Noter le volume exact de KOH-éthanolique nécessaire pour obtenir le virage de la solution au rose fushia.

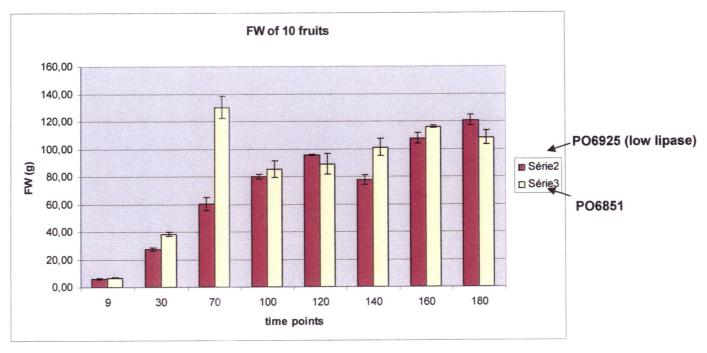
Calculer l'acidité :

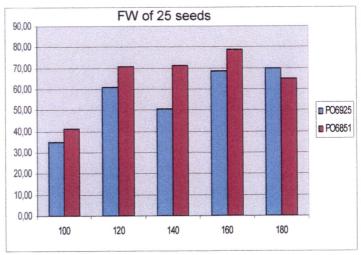
Si le titre de la solution est estimé à 0.085; la masse de prise d'essai est 1 g et le volume de KOH pour entraîner le virage d'une solution ne contenant pas d'huile estimé à 0.2, alors : (volume mesuré -0.2) x ((0.085) x 2.56) / (10 * 1)) soit (vol mesuré -0.2) x 2.176 = % acidité

* voir protocole de PO 016A de G Piombo, CIRAD

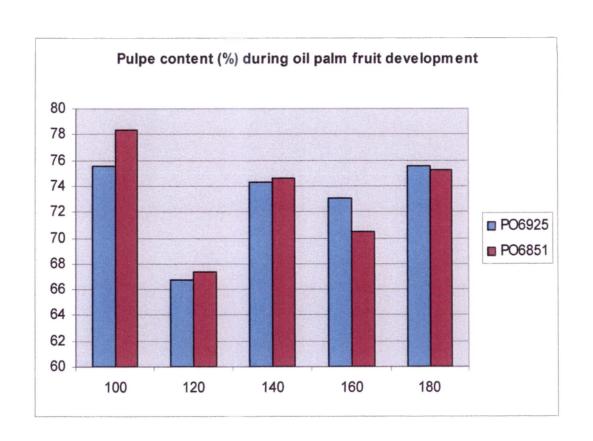
Annexe 5 : <u>Résultats</u>

Fruits and seeds Fresh Weight during fruit development

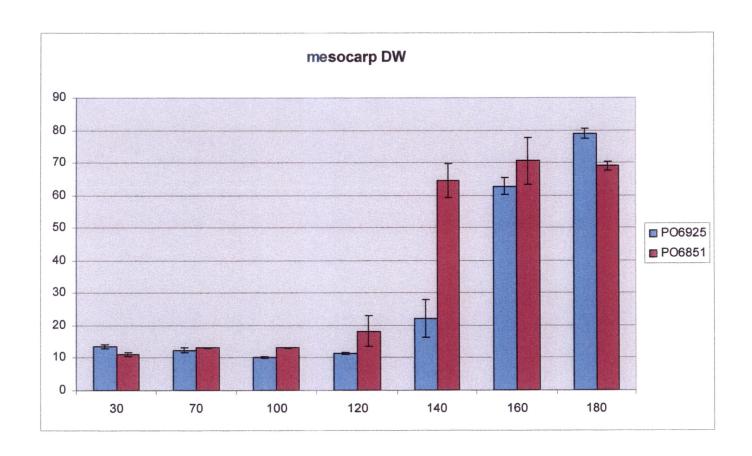




Pulpe content %



Mesocarp dry weight during fruit development



Oil Palm Abscission Experimental system



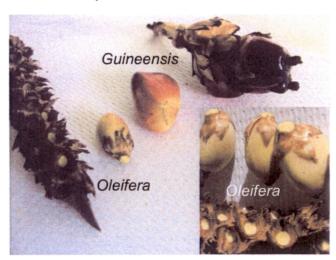
30L Plastic boxes (7x)



Inter- and intra-specific comparisons



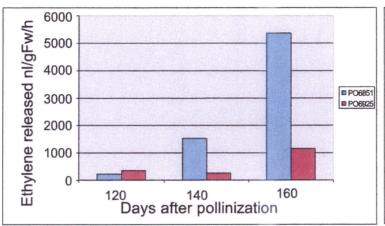
+/- 10µL/L C2H2 treatments



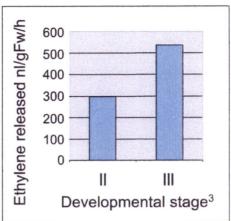
E. Guineensis vs. E. Oleifera

Ethylene release by whole spikelets¹

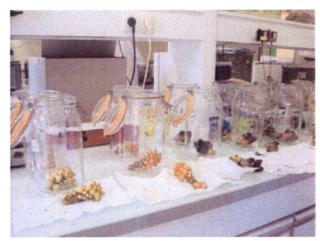
E. Guineensis²



E. Oleifera

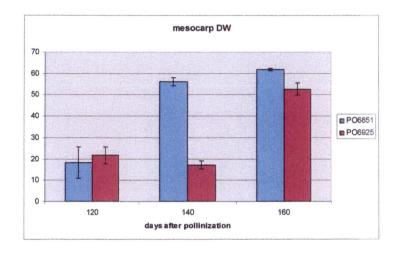


- ¹ Each spikelet consisted of 10 fruits; values are means of duplicates
- ² Two progeny groups tested
- ³ Number of days after pollinization unknown, stages based on fruit color (II, yellow/green; III, orange)

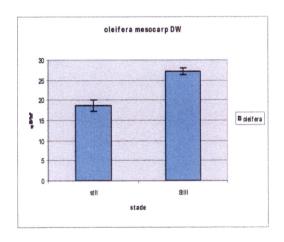


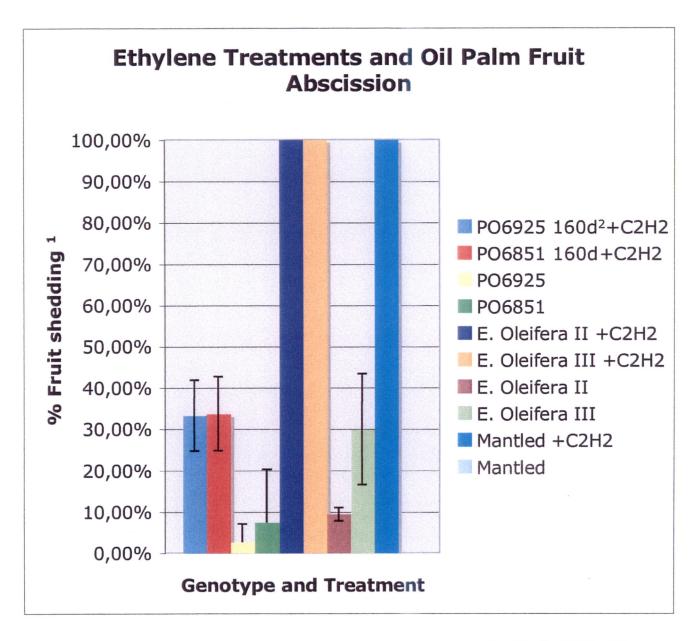
Mesocarp dry weight (from fruit using for ethylene release)

E. guineensis



E. oleifera





¹shedding determined by applying physical pressure to the fruit to detach fruit at position 1 ²160 days after pollinization

Annexe 6 : Abstract for poster submission / Plant Biology 2008 Merida

Tracking Code: PRELIM7595; Access Code: T2879 Primary Investigator Email: tranbarg@mpl.ird.fr

Presenter: Tranbarger, Timothy J.

Authors:

Tranbarger, Timothy J. (A) tranbarg@mpl.ird.fr Verdeil, Jean-Luc (B) jean-luc.verdeil@cirad.fr

Morcillo, Fabienne (A)(B) fabienne.morcillo@mpl.ird.fr

Jantasuriyarat, Chatchawan (D) fscicwj@ku.ac.th

Tregear, James (A) james.tregear@ird.fr

Roongsattham, Peerapat (A) Peerapat.Peerapat@ird.fr

Cros, David (C)(E) david.cros@cird.fr Omore, Alphonse (C) crapp@intnet.bj

Adam, Helene (A) helene.adam@ird.fr

Affiliations:

- (A): Institut de Recherche pour le Developpement, UMR DIAPC, Palm Development Group, France
- (B): Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement,

CIRAD, UMR DAP, PHIV, France

- (C): Institut national de recherche agricole du Benin, INRAB, CRA-PP Pobé, Benin
- (D): Kasetsart University, Department of Genetics, Thailand
- (E): Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement, CIRAD, UPR 28, France

<u>Abstract Title:</u> Molecular and developmental analysis of the fruit abscission zone and shedding process in the oil palm *Elaeis guineensis* and *Elaeis oleifera*.

Category: Tropical Agriculture Biology

Abstract:

Oil palm Elaeis guineensis belongs to the Arecaceae family and is the number one source of edible vegetable oil worldwide. Due to a constant annual increase in demand for vegetable oil for human consumption in addition to the potential use of palm oil as a source of biofuel, here is increasing pressure for higher yields. One factor that limits yield is the loss due to nonsynchronized fruit ripening and subsequent shedding of the ripest fruit before harvest. We have recently initiated a project with the objective of understanding oil palm fruit shedding at the histological, physiological and molecular levels. Previous studies indicate that the fruit shedding process in oil palm is different at the anatomical level from other species. In most fruits, there is a synchronized series of cell separations between the fruit and the stalk that leads to fruit shedding. The shedding of the oil palm fruit consists of at least two coordinated cell separation stages with a delay of 1-2 days between the stages. In the present study we examine the abscission zones and physiological factors that affect the cell separation processes that lead to fruit shedding in the two oil palm species, Elaeis guineensis and Elaeis oleifera. Our results indicate that E. oleifera is significantly more sensitive to ethylene treatments that induce the cell separation processes leading to fruit shedding. In addition, E. oleifera produces significantly less ethylene during fruit development compared with fruit from E. guineensis. Our results indicate that the fruit shedding process differs between the two species and will provide an excellent model for understanding the molecular mechanisms associated with abscission and fruit shedding, a key agronomic character of oil palm.

Annexe 7 : Demande de materiel végétal

Lors de la prochaine mission de David Cros (en juin) si cela est possible nous souhaiterions recevoir à Montpellier :

Epillets

- Des épillets de fruits *mantled* (si possible LMC90 planté en 1988, parcelles 426-1-7 ou 427-8-13) et non *mantled* issus du même clone afin de comparer les effets du traitement de l'éthylène sur les deux types de fruits issus du même génotype.
- Des épillets de fruits *E. guinneensis* (PO6851)
- Des épillets de fruits E. oleifera orange

Le nombre d'épillets minimum nécessaire est de 7. Chacun portant 8 à 10 fruits. Le stade de maturité souhaité est de 160 jours après pollinisation pour PO6851. Pour *E.oleifera*, les fruits les plus matures ainsi que pour le *mantled* et non *mantled*.

Données

Par ailleurs nous souhaiterions avoir plus d'informations sur le développement des *E oleifera* susceptibles d'être prélevés lors d'une prochaine mission en 2009 (dates à définir) :

- la date moyenne après pollinisation du changement de couleur observé chez les régimes
- la date moyenne des régimes à la récolte
- différence entre le matériel d'origine du Brésil et d'Amérique du sud en terme de durée de développement des fruits.

Enfin serait il possible de garder un régime de PO6925 et P06851 au delà de 180 jours après la pollinisation pour estimer son degrés d'abscission. Evaluer l'aspect craquelé ou non de ces fruits. Des mesures complémentaires seront réalisées sur ce matériel pour estimer son délai réel de maturation.

Fabienne Morcillo