

# Cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) : Résultats et perspectives d'application

F. ENGELMANN (1), Y. DUVAL (2)

**Résumé.** — La cryoconservation de jeunes embryoides de palmier à huile est réalisée en utilisant une vitesse de congélation rapide ( $200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Les taux de survie obtenus varient de 50 à 80 p. 100 et l'embryogenèse adventive reprend sur 10 à 20 p. 100 des massifs congelés. Après le traitement rhizogène des pousses feuillées issues des embryoides congelés, les vitroplants sont acclimatés en serre et leur développement s'effectue normalement jusqu'à présent. L'utilisation d'un congélateur programmable pour la congélation des massifs d'embryoïdes, qui permet d'obtenir des vitesses de refroidissement plus précises et parfaitement reproductibles, conduit aux mêmes résultats. La reprise de l'embryogenèse adventive a été observée sur des massifs d'embryoïdes stockés respectivement 7 et 15 mois dans l'azote liquide. Ces résultats permettent d'envisager l'application rapide de cette technique de cryoconservation pour le stockage des lignées d'embryoïdes produits par la culture *in vitro* et son extension par la suite à la conservation des ressources génétiques du palmier à huile.

## INTRODUCTION

La méthode de multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile mise au point par l'ORSTOM et l'IRHO utilise la voie de l'embryogenèse somatique (3) [1, 2]. Les plants sont produits à grande échelle grâce au développement d'embryons adventifs sur les embryons somatiques. Cette embryogenèse adventive se réalise, dans certains cas, de manière continue et permet le maintien en culture *in vitro* de lignées d'embryoïdes pendant plusieurs années. Cette technique est maintenant en cours d'industrialisation [3] mais la création régulière de nouveaux clones qui en découle, pose des problèmes pratiques pour la gestion des laboratoires. En effet l'entretien des cultures nécessite des repiquages réguliers et cet apport constant de matériel *in vitro* implique une augmentation de la surface des salles de culture, des coûts en main-d'œuvre et en matériel. De plus, les cultures ne sont pas à l'abri des risques de contamination. Enfin, le maintien de matériel en culture *in vitro* pendant de longues années présente des risques pour la stabilité génétique des cultures [4, 5]. Cette pratique pourrait en effet conduire à une perte de la conformité des vitroplants produits.

La seule méthode susceptible d'assurer à la fois le maintien des caractéristiques des cultures et leur stockage dans un faible volume et à l'abri des contaminations, avec un entretien réduit, est la cryoconservation c'est-à-dire la conservation à très basse température, généralement celle de l'azote liquide ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A cette température, en effet, les divisions cellulaires sont arrêtées et tous les processus métaboliques sont bloqués [6]. Le matériel végétal

peut ainsi être conservé sans altérations ni modifications pendant une durée théoriquement indéfinie. Outre son application pour le stockage du matériel produit par la culture *in vitro*, seule la cryoconservation peut assurer la conservation à long terme des ressources génétiques du palmier à huile.

La cryoconservation de matériel végétal a déjà été réalisée pour de nombreuses espèces en utilisant des matériels différents, cellules, cals, méristèmes, embryons [7]. Si la résistance à l'azote liquide d'embryons zygotiques et polliniques a déjà été prouvée dans de nombreux cas [8], la congélation d'embryons somatiques n'a encore été réalisée, à notre connaissance, que sur une seule espèce, la carotte [9].

La cryoconservation comporte généralement plusieurs étapes successives [10] pour lesquelles des conditions optimales doivent être déterminées : un prétraitement, qui consiste en une culture du matériel en présence de substances cryoprotectrices, la congélation, le réchauffement puis un post-traitement au cours duquel le matériel est cultivé dans des conditions favorisant la reprise de sa croissance. Des recherches pour appliquer cette technique au palmier à huile ont été entreprises, à la demande de l'IRHO, au Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte (POVAR, CNRS à Meudon, France).

La figure 1 représente les différents niveaux d'application de la cryoconservation qui peuvent être envisagés dans le cycle de multiplication *in vitro* du palmier à huile.

La cryoconservation pourrait ainsi concerner 3 types de matériels : les cals, les structures embryogènes, les embryoides en multiplication. Les cals n'ont pas été utilisés car tous ne sont pas embryogènes [3]. Les embryoides ont été choisis de préférence car ce sont des structures organisées qui se multiplient de manière continue par embryogenèse adventive. Les résultats présentés ici concernent principalement la congélation d'embryoïdes en phase de multiplication. Une expérimentation a été réalisée avec des structures embryogènes.

(1) Laboratoire de physiologie des Organes Végétaux après Récolte (POVAR), CNRS, 4 ter, route des Gardes, 92195 Meudon (France)

(2) IRHO-CIRAD, Laboratoire de Physiologie végétale, Services scientifiques centraux de l'ORSTOM, 72-74 route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

(3) Ces travaux ont été réalisés sous la responsabilité scientifique de C. PANNETIER (2), responsable des programmes Culture *in vitro* de l'IRHO, et de J. DEREUDDRE (1), responsable de l'équipe cryoconservation du POVAR.

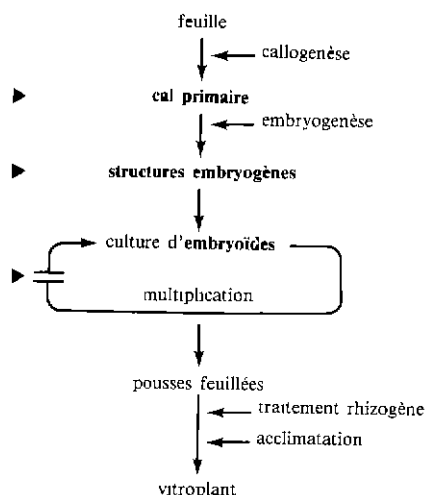


FIG 1. — Représentation schématique du procédé de multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile. Niveaux d'application envisageables de la cryoconservation (►).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. — Matériel végétal.

Deux clones ont été utilisés : l'un issu d'un plant de pépinière, l'autre d'un arbre adulte sélectionné pour sa production en huile. Les cultures d'embryoïdes ont été produites par l'ORSTOM-IRHO à Bondy par une méthode décrite précédemment [1].

Seuls de très jeunes embryoïdes sont susceptibles de résister à la congélation [11, 12] après une déshydratation partielle préalable. Ce type d'embryons est peu fréquent dans les cultures sur milieu standard (Fig 2). Par contre, une culture de 2 mois sur un milieu enrichi en sucre a permis d'obtenir, avec une fréquence élevée, de jeunes embryoïdes non chlorophylliens, d'une taille de 1 à 3 mm (Fig. 3), et qui sont aptes à résister au traitement. Ces embryoïdes ont été utilisés pour nos expériences.

### 2. — Méthodes de congélation.

#### a) Congélation rapide.

Une première technique de congélation rapide ( $200\text{ °C min}^{-1}$ ) a été mise au point [13], elle comporte les étapes suivantes :

— *Prétraitement* : les embryoïdes isolés par massifs (Fig. 4) ont été placés pendant 7 jours sur un milieu fortement concentré en sucre, ce qui a pour effet de diminuer leur teneur en eau de 80 à 60 p. 100 environ par rapport à leur poids de matière fraîche.

— *Congélation* : pour leur congélation, les embryoïdes ont été placés dans des ampoules cryobiologiques stériles qui ont été immergées directement dans l'azote liquide. La vitesse de refroidissement ainsi obtenue est d'environ  $200\text{ °C min}^{-1}$ .

— *Réchauffement* : après un séjour d'une heure dans l'azote liquide, les massifs d'embryoïdes ont été réchauffés en immergeant les ampoules dans un bain-marie thermostaté à  $40\text{ °C}$  pendant 1 minute.

— *Post-traitement* : les embryoïdes ont été cultivés pendant 3 semaines sur des milieux additionnés d'acide 2,4

dichlorophénoxyacétique (2,4-D) progressivement appauvris en saccharose. Les massifs d'embryons ont alors été repiqués sur le milieu de culture standard dépourvu d'auxine.

#### b) Congélation utilisant un congélateur programmable.

L'utilisation d'un congélateur programmable (type Mini-cool, marque CFPO) permet d'obtenir des vitesses de congélation précises et parfaitement reproductibles. Au cours des expériences utilisant un congélateur programmable, les conditions définies pour les autres étapes (prétraitement, réchauffement, post-traitement) n'ont pas été modifiées. Seule la vitesse de refroidissement a été modifiée. Les vitesses de congélation expérimentées ont varié de  $0,5\text{ °C min}^{-1}$  à  $40\text{ °C min}^{-1}$ .

## RÉSULTATS

### 1. — Congélation rapide.

Cette méthode a permis d'obtenir régulièrement des taux de survie de 50 à 80 p. 100 du matériel congelé. La reprise de la prolifération, qui touche 10 à 20 p. 100 des massifs, est observable un mois et demi après la décongélation (Fig. 5). L'adjonction de 2,4-D au milieu de culture, après la congélation pendant une période brève, est obligatoire pour obtenir régulièrement une reprise de la prolifération. En l'absence d'auxine, on assiste dans quelques cas au développement d'un embryoïde en pousse feuillée et la reprise de la prolifération n'est observée que de manière exceptionnelle et aléatoire. Les cultures obtenues à partir des massifs d'embryons congelés ont subi plusieurs cycles de multiplication avant l'isolement de pousses feuillées d'une taille suffisante (Fig. 6) pour subir un traitement inducteur de la rhizogenèse (Fig. 7). Après ce traitement, les vitroplants racinés ont été acclimatés en serre (Fig. 8, 9) avant leur transfert en conditions naturelles.

### 2. — Utilisation d'un congélateur programmable.

La plupart des vitesses de refroidissement utilisées, entre  $0,5\text{ °C min}^{-1}$  et  $40\text{ °C min}^{-1}$ , ont permis d'obtenir des résultats équivalents à ceux décrits précédemment soit : des taux de survie des embryoïdes de 50 à 80 p. 100 et une reprise de la prolifération de 0 à 20 p. 100, suivant le clone considéré et la vitesse de refroidissement. L'avantage présenté par l'emploi d'un congélateur programmable est de permettre l'obtention de vitesses de congélation précises et parfaitement reproductibles d'un essai à l'autre, ce qui n'est pas forcément le cas avec la congélation rapide.

### 3. — Cryoconservation des structures embryogènes.

Une expérience de congélation a aussi été réalisée sur ce type de matériel en utilisant la première méthode décrite (congélation rapide à  $200\text{ °C min}^{-1}$ ). La reprise de la prolifération a été observée sur 20 p. 100 des massifs congelés sans qu'il soit nécessaire d'incorporer du 2,4-D au milieu de culture pendant le post-traitement. Les premières pousses feuillées issues de ces cultures sont en cours d'enracinement.

### 4. — Durée de stockage dans l'azote liquide.

La reprise de la prolifération a été obtenue à partir d'embryoïdes d'un clone stockés 7 mois dans l'azote liquide, sans que l'on observe de diminution du taux de reprise (20 p. 100). Les premières pousses feuillées issues de

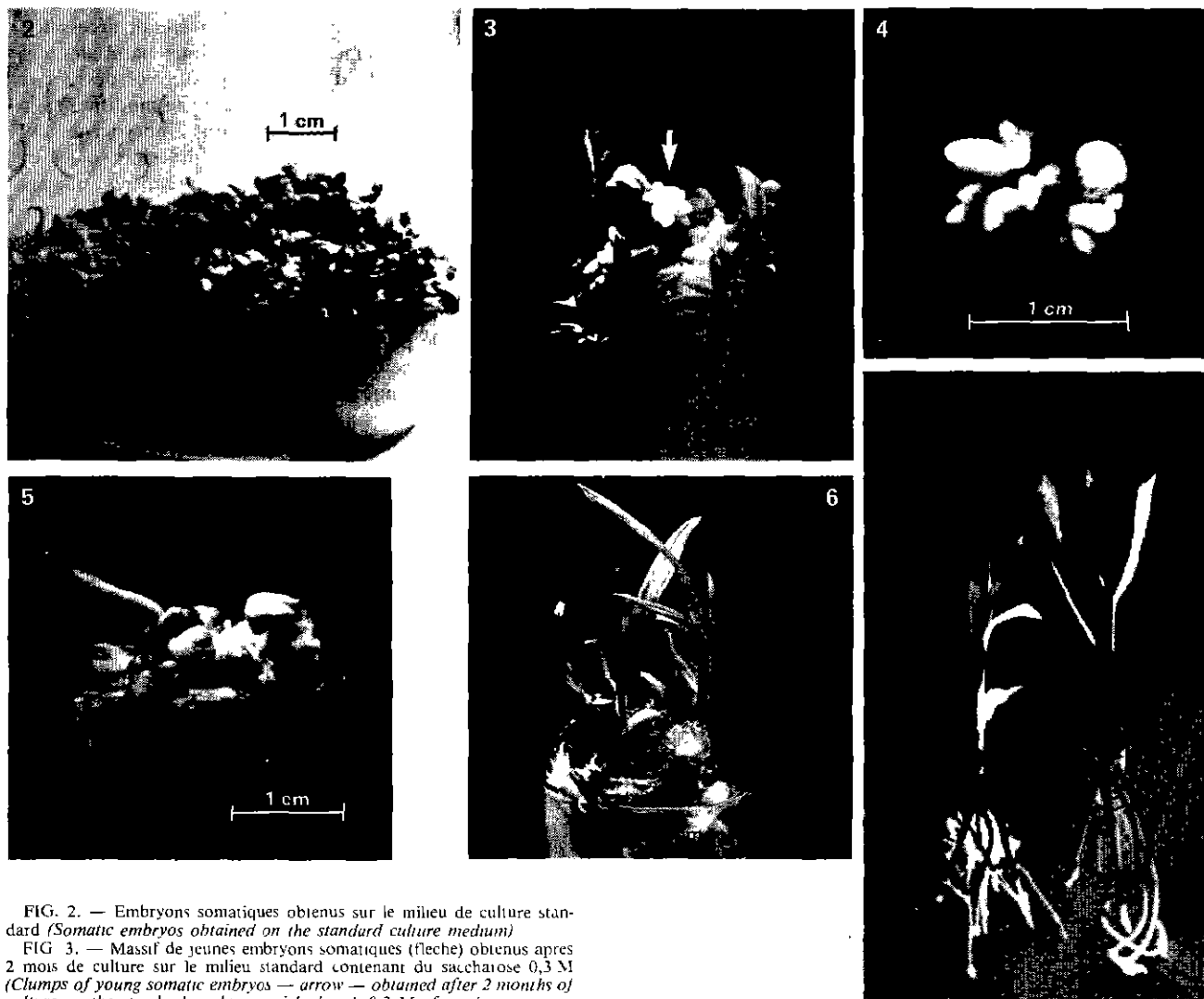


FIG. 2. — Embryons somatiques obtenus sur le milieu de culture standard (*Somatic embryos obtained on the standard culture medium*)

FIG. 3. — Massif de jeunes embryons somatiques (fleche) obtenus apres 2 mois de culture sur le milieu standard contenant du saccharose 0,3 M (*Clumps of young somatic embryos — arrow — obtained after 2 months of culture on the standard medium enriched with 0.3 M of saccharose*).

FIG. 4. — Massif d'embryons somatiques en cours de pretraitement sur le milieu standard fortement concenre en saccharose (*Somatic embryo clumps during the pre-treatment on the standard medium enriched with a high concentration of saccharose*).

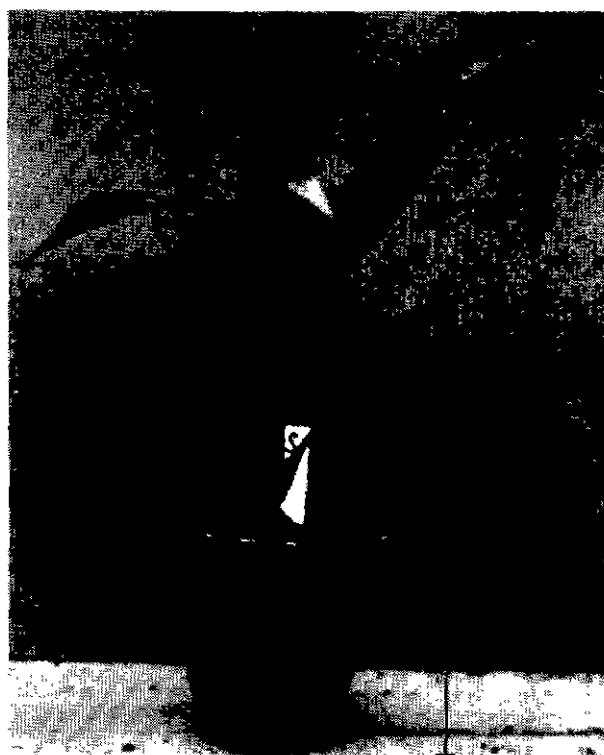
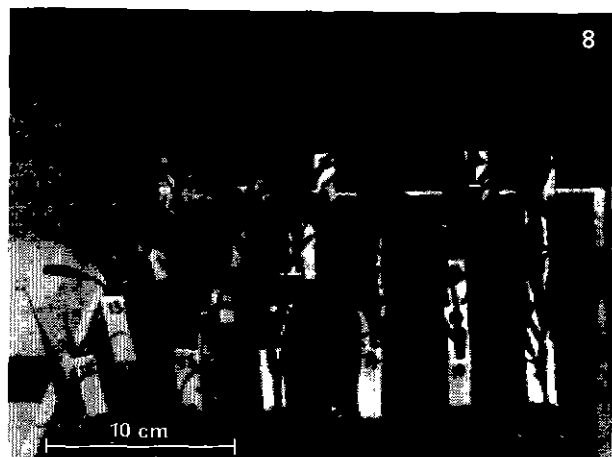
FIG. 5. — Reprise de l'embryogenese adventive, 2 mois apres la décongélation (*Adventive embryogenesis renewal 2 months after thawing*)

FIG. 6. — Obtention de pousses feuillées issues d'embryons somatiques congelés dans l'azote liquide (*Obtainment of shoots from somatic embryos frozen in liquid nitrogen*)

FIG. 7. — Plantules apres traitement rhizogene (*Plantlets after rooting treatment*).

FIG. 8. — Vitroplants en acclimatation en serre (*Vitro-plants being acclimatized in the greenhouse*).

FIG. 9. — Vitroplant apres 3 mois et demi d'acclimatation (*Vitro-plant after 3 1/2 months of acclimatization*)



ces cultures sont en cours d'enracinement. Récemment, une reprise de la prolifération a été également observée à partir de massifs d'embryons du même clone stockés 15 mois dans l'azote liquide. L'augmentation de la durée de conservation à  $-196^{\circ}\text{C}$  ne semble donc pas avoir d'influence sur la reprise de la prolifération des embryoides congelés.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La méthode de congélation des embryons somatiques de palmier à huile mise au point permet d'obtenir de manière reproductible la reprise de la prolifération de massifs d'embryoides congelés. Les pousses feuillées produites après la multiplication de ces massifs peuvent être enracinées puis acclimatées en serre, et leur développement est jusqu'à présent comparable à celui de plants issus de massifs non congelés. L'augmentation de la durée de stockage dans l'azote liquide ne semble pas avoir d'effet sur la reprise du matériel congelé puisque, après un séjour de 7 mois dans l'azote liquide, les massifs d'embryons reprennent aussi bien leur prolifération et produisent des pousses feuillées qui s'enracinent normalement. On observe également une reprise de la prolifération sur des massifs stockés 15 mois à  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Avant son application, la méthode proposée doit être testée sur d'autres clones. Si des différences de comportement se révèlent entre les divers clones, comme cela a déjà

été observé sur plusieurs matériels [14, 15], une adaptation de la méthode à ces cas particuliers s'avérerait nécessaire. De plus, le développement en conditions naturelles des plants issus de massifs d'embryoides congelés devra être suivi pour vérifier que le cryotraitement ne modifie pas la conformité du matériel. Les formations embryogènes ont un taux de reprise comparable à celui des embryoides en multiplication, et l'enracinement des premières pousses feuillées issues de ces cultures semble satisfaisant. De nouvelles expérimentations doivent être menées avec ces structures qui présentent l'intérêt, par rapport aux embryons en multiplication, de ne pas nécessiter l'adjonction d'auxine après leur décongélation pour obtenir la reprise de leur prolifération. De plus, la durée de culture *in vitro* de ces structures est inférieure à celle des embryoides en multiplication, ce qui diminue les risques de dérive génétique du matériel.

Enfin, cette technique pourra être appliquée à la conservation d'embryons zygotiques de palmier à huile, pour lesquels les travaux de Grout *et al.* [16] ont déjà montré que la cryoconservation était réalisable. Elle pourrait de même être étendue à la conservation d'embryons zygotiques immatures de cocotier dont l'IRHO maîtrise la culture *in vitro*.

Les résultats présentés dans cet article permettent d'envisager dans un avenir proche la cryoconservation des lignées d'embryoides produits par le procédé de multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile. L'extension de cette technique à la congélation des embryons zygotiques permettra la conservation à long terme des ressources génétiques du palmier à huile.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] PANNETIER C., ARTHUIS P., LIEVOUX D. (1981). — Néof ormation de jeunes plants d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oléagineux*, 36, N° 3, p. 119-122 (langue fr.-angl.-esp.)
- [2] HANOVER J. et PANNETIER C. (1982). — *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. *Proc 5th Intl. Congr. Plant., Tissue and Cell Culture*, Fujiwara A., Ed., Tokyo, Jap., p. 745-746.
- [3] NOIRET J. M., GASCON J. P. et PANNETIER C. (1985). — Perspectives de production de vitro-plants de palmier à huile. *Cah. Ing. Agron.*, Dec 84-Janv. 85, N° 382 (N° spéc., Biotechnologie, 1 — L'enseignement et la recherche), p. 57-64.
- [4] BAYLISS M. W. (1980). — Chromosomal variation in plant tissues in culture. *Int. Rev. Cytol., Suppl.*, 11A, p. 113-114
- [5] REISCH B. (1984). — Genetic variability in regenerated plants. In: *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1, Techniques for propagation and breeding*, Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V. and Yamada Y., Eds., MacMillan, New York, U.S.A., p. 748-769
- [6] KARTHA K. K. (1981). — Gene pool conservation through tissue culture. *Proc. COSTED Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants*, Singapore, Rao A. N., Ed., p. 213-218.
- [7] WITHERS L. A. (1983). — Germplasm storage in plant biotechnology. In: *Plant Biotechnology*, Mantell S. H. et Smith H., Eds. University Press, Cambridge, G.B., Society for Experimental Biology Seminar Series 18, p. 187-218
- [8] BAJAY Y. P. S. (1985). — Cryopreservation of embryos. In: *Cryopreservation of plant cells and organs*, Kartha K. K., Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., p. 227-242
- [9] WITHERS L. A. (1979). — Freeze-preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol.*, 63, p. 460-467.
- [10] KARTHA K. K. (1982). — Cryopreservation of germplasm using meristem and tissue. In: *Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry*, Tomes D. T., Ellis B. E., Harney P. M., Kasha K. J. et Peterson R. L., Eds, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, p. 139-161.
- [11] WITHERS L. A. (1980). — Tissue culture storage for genetic conservation — *IBPGR Technical Report*, Rome, Ital., 91 p.
- [12] HENSHAW G. G. (1982). — Tissue culture methods and germplasm storage. *Proc 5th Intl. Congr. Plant., Tissue and Cell Culture*, Fujiwara A., Ed., Tokyo, Jap., p. 789-792.
- [13] ENGELMANN F., DUVAL Y. et DEREUDDRE J. (1985). — Survie et prolifération d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) après congélation dans l'azote liquide. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 301, Sér. III, 3, p. 111-116
- [14] KARTHA K. K., LEUNG N. L. et MROGINSKI L. A. (1982). — *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Z. Pflanzenphysiol.*, 107, p. 133-140
- [15] GALERNE M. (1985). — Effets du saccharose sur la résistance à la congélation dans l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) des méristèmes d'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivés *in vitro*. *D.E.A. Biologie et Physiologie Végétale, Université Paris VI*, Fr., 74 p.
- [16] GROUT B. W. W., SHELTON K. et PRITCHARD H. W. (1983). — Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann Bot.*, 52, p. 381-384.



## SUMMARY

**Cryopreservation of oil palm somatic embryos (*Elaeis guineensis* Jacq.) : Results and application prospects.**

F. ENGELMANN, Y. DUVAL, *Oléagineux*, 1986, 41, N° 4, p. 169-174.

The cryopreservation of young oil palm embryos employs a rapid freeze rate (200 °C min<sup>-1</sup>). Survival rates obtained vary from 50 to 80 p. 100 and adventive embryogenesis recurs on 10-20 p. 100 of the frozen embryo clumps. The shoots from this frozen material undergo rooting treatment, and the resulting plantlets are acclimatized in a greenhouse; their development has so far been normal. The use of a programmable freezer, which enables precise and perfectly reproducible freezing rates, gives the same results. Adventive embryogenesis resumption has been observed on embryo clumps stored for 7 and 15 months respectively in liquid nitrogen. These results provide hope for the rapid application of this cryopreservation technique with regard to the storage of embryo strains produced by *in vitro* culture and later on to its extension for the long-term storage of oil palm genetic resources.

## RESUMEN

**Crioconservación de embriones somáticos de palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) : Resultados y perspectivas de aplicación.**

F. ENGELMANN, Y. DUVAL, *Oléagineux*, 1986, 41, N° 4, p. 169-174.

La crioconservación de embrioides jóvenes de palma africana se lleva a cabo utilizando una velocidad de congelación rápida (200 °C min<sup>-1</sup>). Los porcentajes de supervivencia varían de un 50 a un 80 p. 100 y la embriogénesis adventicia se reanuda en un 10 a un 20 p. 100 de macizos congelados. Después del tratamiento rizógeno de brotes con hojas procedentes de embrioides congelados, se aclimatan las plántulas *in vitro* en invernadero y su desarrollo se lleva a cabo normalmente hasta la fecha. La utilización de un congelador programable para la congelación de macizos de embrioides permite conseguir velocidades de enfriamiento más precisas y perfectamente reproducibles, conduciendo a los mismos resultados. Se observó un nuevo incremento de la embriogénesis adventicia en macizos de embrioides almacenados durante 7 y 15 meses respectivamente en nitrógeno líquido. Estos resultados permiten considerar una aplicación rápida de esta técnica de crioconservación para el almacenamiento de líneas de embrioides producidos por el cultivo *in vitro* y su aplicación posterior a la conservación de los recursos genéticos de la palma africana.

## Cryopreservation of oil palm somatic embryos (*Elaeis guineensis* Jacq.) : Results and application prospects

F. ENGELMANN (1), Y. DUVAL (2)

## INTRODUCTION

The oil palm *in vitro* propagation process perfected by ORSTOM and the IRHO involves somatic embryogenesis [1, 2]. Plants are produced on a large scale by means of adventive embryo development on somatic embryos. In certain cases, adventive embryogenesis occurs continuously, making it possible to maintain *in vitro* embryo strains for several years. This technique is now being commercialized [3], but laboratory organization problems arise with the continuous creation of new clones. In effect, maintaining cultures necessitates regular transfers, and this constant increase in *in vitro* material requires additional culture room space and more out-lay in labor and equipment. Moreover, cultures are not completely sheltered from the risk of contamination. Finally, keeping *in vitro* culture material over many years is likely to undermine genetic stability [4, 5]. This practise could, in fact, lead to the production of vitroplants which do not conform.

The only method likely to ensure genetic stability and enable limited contamination-free storage is cryopreservation: preservation at a very low temperature, usually that of liquid nitrogen (-196 °C). At this temperature, cells no longer divide and all metabolic processes come to a halt [6]. Hence, planting material can be preserved, without changes or modifications, over a theoretically unlimited period of time. In addition to using cryopreservation for the storage of material produced by *in vitro* culture, only this technique can ensure the long-term preservation of oil palm genetic resources.

Cryopreservation has already been undertaken on numerous other plant species, using different material: cells, calluses, meristems, embryos [7]. Though zygotic and pollen embryo

resistance to liquid nitrogen has already been proven many times [8], the freezing of somatic embryos has, to our knowledge, only been carried out on one species: the carrot [9].

Cryopreservation generally comprises several successive steps [10], for which optimum conditions have to be determined: a pre-treatment, which consists in culturing material in the presence of cryoprotective substances, freezing, thawing, and finally, a post-treatment during which the material is grown under conditions favoring growth recovery. At the IRHO's request, research was undertaken at POVAR (Post-Harvest plant organ laboratory, CNRS, Meudon) on the applicability of this technique to oil palm.

Figure 1 gives different cryopreservation application possibilities for the oil palm *in vitro* propagation process.

Hence, cryopreservation could be applied to 3 types of material: calluses, embryogenic structures and proliferating embryos. Calluses were not used because they are not all embryogenic [3]. Preference was given to embryos because they are organized structures which multiply continuously through adventive embryogenesis. The results given here chiefly concern the freezing of embryos at the propagation stage. One experiment was carried out with embryogenic structures.

## MATERIALS AND METHODS

## 1. — Planting material.

Two clones were used: one obtained from a nursery seedling, the other from an adult tree selected for its oil production. Embryo cultures were produced by ORSTOM-IRHO, Bondy, using a method described earlier [1].

Only very young embryos are likely to withstand freezing [11, 12] after prior partial dehydration. This type of embryo is infrequently found in cultures on a standard medium (Fig. 2). On the other hand, a two-month old culture on a sugar enriched medium gave young non-chlorophyllous embryos at a high frequency rate, each from 1 to 3 mm (Fig. 3) and capable of withstanding the treatment. These embryos were used in our experiments.

(1) (POVAR), Post-harvest plant organ physiology Laboratory, CNRS, 4 ter, route des Gardes, 92195 Meudon (France).

(2) IRHO-CIRAD, Plant physiology Laboratory, ORSTOM Central scientific services, 72-74 route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

(3) This research was carried out under the scientific responsibility of C. PANNETIER (2), Head of the IRHO *in vitro* culture programmes and J. DEREUDDRE (1), Head of the POVAR cryopreservation team

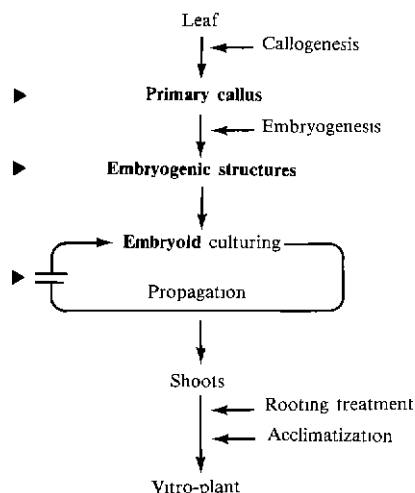


FIG. 1. — Schematic representation of the oil palm *in vitro* vegetative propagation process. Cryopreservation application possibilities are marked with an arrow (▶).

## 2. — Freezing methods.

### a) Rapid freezing.

An initial rapid freeze technique ( $200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) was developed [13], comprising the following steps :

— *Pretreatment* : embryoids isolated in clumps (Fig. 4) were placed for 7 days on a medium with a very high concentration of sugar, which resulted in reducing their water content from about 80 to 60 p. 100 compared with their fresh weight.

— *Freezing* : embryos were placed in sterile cryobiological ampoules, which were then immediately immersed in liquid nitrogen. The freezing rate obtained was about  $200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

— *Thawing* : after immersion in liquid nitrogen for about 1 hour, embryoid clumps were thawed by immersing the ampoules in a water-bath kept at  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 minute.

— *Post-treatment* : the embryoids were cultured for 3 weeks on mediums enriched with 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) whilst the sugar content was gradually reduced. These embryoid clumps were then transferred to the standard culture medium without auxin.

### b) Freezing with a programmable freezer.

The use of a programmable freezer (Mimcool type — by CFPO) makes it possible to obtain exact and perfectly reproducible cooling rates. In experiments where the programmable freezer was used, conditions defined for the other steps (pretreatment, thawing, post-treatment) remained the same. Only the cooling rate was modified, varying from  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to  $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

## RESULTS

### 1. — Rapid freezing.

This method regularly gave frozen material survival rates of 50 to 80 p. 100. Renewed multiplication, observed on 10-20 p. 100 of the embryoid clumps, was noted 1 1/2 months after thawing (Fig. 5). Adding 2,4-D to the culture medium is essential for a short period after freezing to ensure a regular resumption of multiplication. Without auxin, a few embryoids developed into shoots and in these cases, resumed multiplication was exceptional and uncertain. Cultures obtained from frozen embryoid clumps went through several multiplication cycles before sufficiently large enough shoots could be isolated (Fig. 6) for the inductive rooting treatment (Fig. 7). After this treatment, rooted vitro-plants were

acclimatized in a greenhouse (Fig. 8, 9) and then transferred to natural growing conditions.

### 2. — Use of a programmable freezer.

Most of the freeze rates used, i.e. between  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to  $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , gave results similar to those above : embryoid survival rates from 50 to 80 p. 100 and resumed multiplication from 0 to 20 p. 100, depending on the clone observed and the cooling rate. The advantage of using a programmable freezer is that **exact and perfectly reproducible freeze rates** can be obtained from one trial to the next, which is not always the case with the rapid-freeze technique.

### 3. — Cryopreservation of embryogenic structures.

A freezing experiment was also carried out on embryogenic structures, using the first method described (rapid freezing at  $200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Resumed multiplication was observed on 20 p. 100 of the frozen clumps, even **without adding 2,4-D to the culture medium during post-treatment**. The first shoots resulting from these cultures are now at the rooting stage.

### 4. — Storage time in liquid nitrogen.

Resumed multiplication was observed on embryoids obtained from a clone stored 7 months in liquid nitrogen without a visible reduction in the resumption rate (20 p. 100). The first shoots resulting from these cultures are now at the rooting stage. Recently, resumed multiplication was also observed on embryoid clumps from the same clone stored 15 months in liquid nitrogen. Hence, longer storage at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  does not seem to influence frozen embryoid multiplication resumption.

## CONCLUSIONS AND PROSPECTS

The oil palm somatic embryo freezing method which has been developed makes it possible for frozen embryoid clumps to undergo resumed multiplication on a continual basis. Shoots produced after clump propagation can be rooted then acclimatized in the greenhouse and their development to date has been comparable to that of plants obtained from non-frozen clumps. Longer storage in liquid nitrogen does not seem to influence frozen material revival, given that after 7 months in liquid nitrogen, embryo clumps still undergo resumed multiplication and shoots appear which develop normally. Resumed multiplication was also observed on clumps stored 15 months at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Before applying the method proposed, it should be tested on other clones. If behavioural differences between various clones are noted, as have already been observed on several different types of material [14, 15], the method will have to be adapted to each particular case. Moreover, the development of plants obtained from frozen embryoid clumps under natural conditions has to be followed to confirm that cryotreatment do not modify material conformity. The embryogenic formation resumption rate is comparable to that of multiplying embryoids and root development on the first shoots obtained from these cultures seems satisfactory. New experiments should be carried out on these structures, whose merit, in comparison to multiplying embryos, lies in the fact that auxin is not required after thawing to obtain resumed multiplication. Furthermore, the period during which these structures have been cultivated *in vitro* is shorter than that of multiplying embryos, which reduces the risk of genetic variation.

Finally, this technique could be applied to oil palm zygotic embryo preservation, of which research by Grout *et al.* [16] has already shown that cryopreservation is possible. This technique could even be applied to the preservation of coconut immature zygotic embryos, whose *in vitro* culture the IRHO is perfecting.

The results given in this article provide hope in the near future for the application of cryopreservation to embryoid strains produced by the oil palm *in vitro* vegetative propagation process. Extending this technique to the freezing of zygotic embryos would enable long term preservation of oil palm genetic resources.