

Histology of embryogenic formations during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq.

J. SCHWENDIMAN (1), C. PANNETIER (2), N. MICHAUX-FERRIÈRE (1)

Summary. — Histological analysis was carried out to investigate the formation and evolution of embryogenic cells and nodules during *in vitro* vegetative propagation of oil palm. Primary calli isolated from explants proliferated on a medium with 2,4-D, cytokinin and activated charcoal. When culture conditions were favourable the cambium-like zone which assumed the proliferation of nodular calli became embryogenic. This histological modification was described. Embryogenic cells became isolated specially towards the edges of the calli, undergoing few internal divisions but the proembryos formed did not develop further. The stoppage of this unicellular process was discussed. Evolution of the calli continued from the numerous meristematic centres which then formed. These centres were made of very active cells displaying special characteristics which were described. The activity of these centres resulted in the emergence of small whitish nodules. These became isolated with the formation of an epidermis, polarized and gave rise to somatic embryos. At this stage, they were transferred to a hormone-free medium where adventitious budding took place. This multicellular process in oil palm somatic embryogenesis is discussed in relation to histological work on other palms.

Key words : oil palm, *Elaeis guineensis*, histology, somatic embryogenesis, embryogenic cells.

INTRODUCTION

The African oil palm, *Elaeis guineensis*, is a totally allogamous species for which conventional methods of vegetative propagation cannot be used. The advantages of cloning the best plants are obvious and different teams have worked on perfecting procedures aimed at regenerating oil palm through somatic embryogenesis. Reviews have been published : Blake, 1983 ; Paranjothy, 1984 ; Brackpool *et al.*, 1986 ; Krikorian and Kann, 1986 ; Jones and Hughes, 1989.

Joint research carried out by ORSTOM and IRHO/CIRAD led to a plantlet regeneration process involving somatic embryogenesis from young leaflet explants. Two somatic embryogenesis pathways have been described : the obtaining of somatic embryos from friable, fast-growing cultures (Rabéchault and Martin, 1976 ; Ahée *et al.*, 1981) or from slow-growing nodular calli isolated from explants (Pannetier *et al.*, 1981). For maximum avoidance of somaclonal variation risks, the latter procedure was developed for large-scale plantlet production (Duval *et al.*, 1988 ; Durand-Gasselien *et al.*, 1989).

We carried out histological analysis of the somatic embryogenesis process through nodular calli. Various observations have been published on the anatomical structure of *in vitro* cultures of oil palm, coconut and date palm (Reynolds and Murashige, 1979 ; Tisserat and DeMason, 1980 ; Pannetier and Buffard-Morel, 1982, 1986 ; Nwankwo and Krikorian, 1983 ; Branton and Blake, 1983). We described histological analysis of the successive stages in obtaining oil palm somatic embryos and plantlets in a previous paper (Schwendiman *et al.*, 1989). However, this should be examined in greater depth with focus on the phenomena leading to the appearance of embryogenic formations.

MATERIALS AND METHODS

The method developed by ORSTOM and IRHO/CIRAD and applied on a large scale uses fragments of non-

chlorophyllian leaflets taken from young leaves in the spear of the oil palm without damaging the terminal meristem. After a callogenesis period during which the explants are maintained on media containing auxins, embryogenic structures are obtained on calli subcultures on a medium containing 2,4-D, cytokinins and activated charcoal (Hanower and Pannetier, 1982 ; Duval *et al.*, 1988). When the embryogenic formations are well developed, they are subcultured on a hormone-free medium for the embryo proliferation and plantlet development phase. The Vegetative Propagation Laboratory at La Mé, Côte-d'Ivoire, provided material for histological study. The samples were fixed in the following solution : 50 ml phosphate or sodium cacodylate 0,2 M buffer, neutral pH, 20 ml paraformaldehyde 10 %, 4 ml glutaraldehyde 25 %, 1 g caffeine, 26 ml distilled water. After dehydration in a series of alcohol baths, they were embedded in LKB Historésine and cut into 3-micrometre sections. Different staining procedures were used, and in particular periodic acid-Schiff reaction combined either with Regaud's haematoxylin, toluidine blue or protein-specific naphthol blue-black (Fisher, 1968).

RESULTS

Distinction can be made between different phases of the *in vitro* process leading to obtaining somatic embryos in the oil palm (Schwendiman *et al.*, 1988). Some of the histological phases are mentioned briefly here to examine the formation and evolution of embryogenic cells and nodules on which our analysis was focused.

1. — Primary callogenesis.

Internal calli formed along veins after the reactivation of perivascular cells in the leaf explants. Growth took the form mainly of a cambium-like zone consisting of 4 to 5 cell layers. Radial rows of cells are formed by division. These frequently contain several starch grains towards the outside. There is no starch in the inner rows, where some cells are loaded with phenolic compounds. Callus proliferation leads to dissociation of leaf structure with breakage of the epiderm. Calli visible to the naked eye are then removed and cultured on a second medium.

(1) Laboratoire de Cytogénétique, CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

(2) Laboratoire de Biologie Cellulaire INRA, 78026 Versailles Cedex (France).

2. — Callus proliferation.

Calli proliferate by invaginations of the cambium-like zone resulting in a set of interconnected nodular formations. The inner part of the nodules consists of differentiated cells, some of which may accumulate polyphenols. The cells degenerate outside the cambium-like zone; the nodules acquire a light brown coating formed by accumulation of the flattened walls of dead cells. No reserve was detected in the cells. Depending on the tree and probably on the genotype used, proliferation of nodular cells can continue for a long time (several years) without noteworthy morphological or histological change. In contrast, in the most favourable cases, new structures can be detected at a very early stage (less than a month after the beginning of proliferation).

3. — Origin of embryogenic formations.

Important histological modification is observed in the cambium-like zone when nodular calli evolve favourably (Fig. 1A, B). The zone changes steadily and rapidly from being a few layers of meristematic cells and now displays numerous histological characteristics typical of embryogenic cells (Fig. 1C): high nuclear-cytoplasmic ratio with a large centrally positioned nucleus, a single, bulky, very stainable nucleolus, dense, little-vacuolized cytoplasm stained to intense blue by naphthol blue-black indicating a high soluble protein concentration, the presence of starch grains which are usually scattered in the cytoplasm. Finally, gelification of the middle lamella physically isolates cells from each other and gives them a rounded appearance. These embryogenic cells almost simultaneously undergo one or two internal compartmentation divisions.

This gives a new status to the cells which previously formed the cambium-like zone, and the latter is no longer recognizable. This process then seems to spread inwards in the nodules (Fig. 1D), but is less marked towards the outside in the few cell layers beneath the coating of membranes. Except in their peripheral zone, nodular calli become increasingly formed of embryogenic cells and 2 or 4-cell embryos (Fig. 1E, F) isolated from each other by gelified membranes but still coated with cell wall fragments. It therefore remains totally hidden from the observer and can only be detected by histological examination.

At this stage, another important histological modification takes place in the nodules formed by embryogenic cells. Numerous meristematic centres (Fig. 1G) which appear to be distributed at random become established in the callus. These centres stand out by the intense staining of cytoplasm (Fig. 1H), which is very rich in soluble proteins but contains no starch reserves. Nuclei are very bulky, rounded and contain 1 or 2 intensely stained nucleoli. The cells divide actively and numerous mitotic structures are seen.

In the immediate vicinity of these sites, the cells conserve their preceding embryogenic state, which is seen in particular by the presence of starch grains scattered in the cytoplasm. There is a tendency, in particular towards the edge of calli, for embryogenic cells to become isolated and undergo several internal divisions which gives them the appearance of proembryos (Fig. 2A). However, this attempt does not appear to be able to continue for more than a few divisions and the cells forming proembryos vacuolize, lose their starch reserves and finally degenerate (Fig. 2B).

Subsequent evolution of calli is from the meristematic centres (Fig. 2C). A great number of cell divisions take place; the calli lose their compactness and small whitish

nodules (Fig. 2D) referred to as embryogenic formations emerge from the coating of dead cell walls which had previously covered them.

4. — Subsequent development of embryogenic formations.

These formations are clusters of several thousand closely packed meristematic cells (Fig. 2E). Their cytoplasm is dense and rich in reserve proteins. Protein granules are numerous and small and tend to become more bulky and less numerous towards the outside. These clusters become isolated by the formation of a protoderm (Fig. 2F) and then a true epidermis. One or two layers of peripheral cells differentiate, with a decrease in nucleus volume, loss of nucleolar activity and above all disappearance of the protein reserves which, however, remain substantial in underlying cell layers. Some peripheral cells vacuolize and doubtless exfoliate.

The establishment of a true epidermis finally isolates the nodule and appears to precede polarity (Fig. 2G). Histologically, polarity results in the differential distribution of starch grains, which collect mainly at the bases of future somatic embryos (Fig. 2H). The lower part of the nodule consists of meristematic cells, from which then grow bundles of provascular strands (Fig. 3A, B) whose divisions accompany growth of embryos. Other reserves (lipid and protein) become steadily larger (Fig. 3C, D) while the formation of starch grains almost ceases. During this organization and growth phase, it is easy to distinguish the embryogenic formations (Fig. 3E) from the underlying calli because of their compact, smooth, white pearly appearance resulting from their epidermis (Fig. 3F, G).

The embryogenic structures display intense growth; domes visible to the naked eye will become the somatic embryos. At this stage, the embryogenic formations are isolated from the underlying callus and cultured on a hormone-free medium. A proliferation phenomenon takes place and a culture consisting of a complex mass of embryogenic formations and somatic embryos at different stages of development (Fig. 3H, I) is obtained. Continuous proliferation of this type of culture enables mass production of plantlets.

DISCUSSION

There are a number of constraints in *in vitro* culture of the oil palm for the vegetative propagation of the best genotypes. The most important phase is the induction of embryogenic cells. This takes place in nodular calli isolated from the explant and proliferating. It first concerns the meristematic cells in the cambium-like zone and then spreads to the inner parenchyma cells. However, without time-sequence sectioning, the possibility that the now embryogenic cells are generated from active divisions of the cells which previously formed the cambium-like zone cannot be excluded. There is a relative synchrony in the appearance of embryogenic cells for most of the nodules forming a callus in the same test tube, suggesting that adequation occurs at a certain moment between the proliferating nodular calli and the physico-chemical culture conditions.

One of the first histological signs of induction of embryogenesis is the gelling of the middle lamella. This reveals a process of physical (and probably physiological) isolation which, according to Wetherell (1984), can suppress the repressive effect on embryogenesis caused by neighbouring cells. Button *et al.* (1974) and Profumo *et al.* (1987) observed

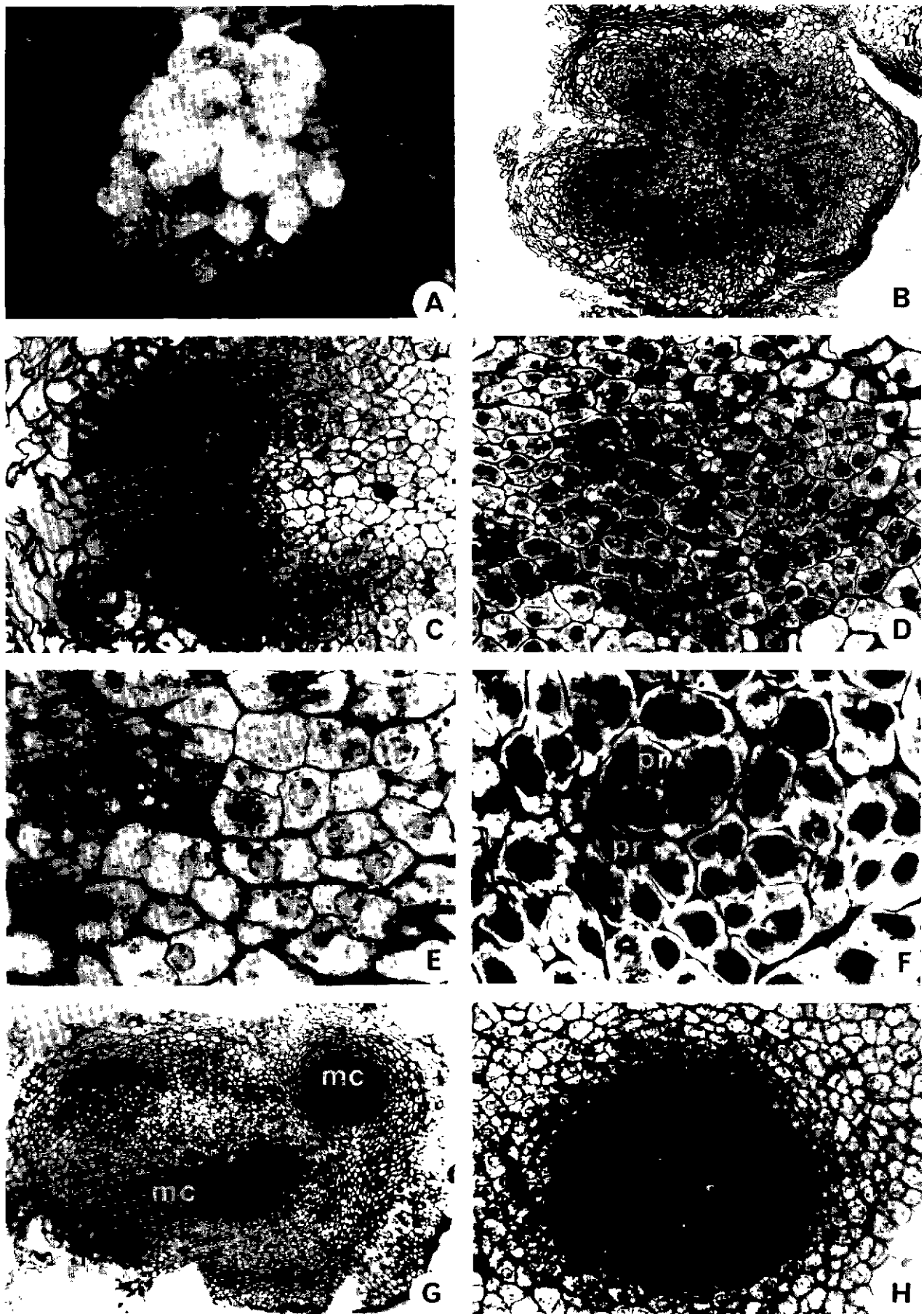


FIG. 1. — A - View of a nodular callus $\times 4$ B - Cross section of this callus showing the modification of the cambium-like zone in an embryogenic area. $\times 165$ D - Section of nodule whose internal zone is embryogenic $\times 266$ E - Cell division in an embryogenic callus. $\times 660$ F - Group of embryogenic cells and procambryos (pr) $\times 660$ G - Formation of meristematic centres (mc) in an embryogenic callus $\times 66$ H - Very active meristematic centre surrounded by embryogenic cells $\times 266$ — { A - Aspect externe d'un nodulaire $\times 4$ B - Section dans ce cal, montrant la modification de la zone pseudocambiale. $\times 50$ C - Evolution de la zone pseudocambiale en zone embryogène. $\times 165$ D - Section au sein d'un nodule dont la zone interne est devenue embryogène. $\times 266$ E - Divisions et reclonnements cellulaires dans un cal embryogène $\times 660$ F - Ensemble de cellules embryogènes et de procambryos (pr) $\times 660$. G - Formation de foyers méristématiques (mc) dans un cal embryogène $\times 66$. H - Foyer méristématique très actif, entouré de cellules embryogènes $\times 266$ }

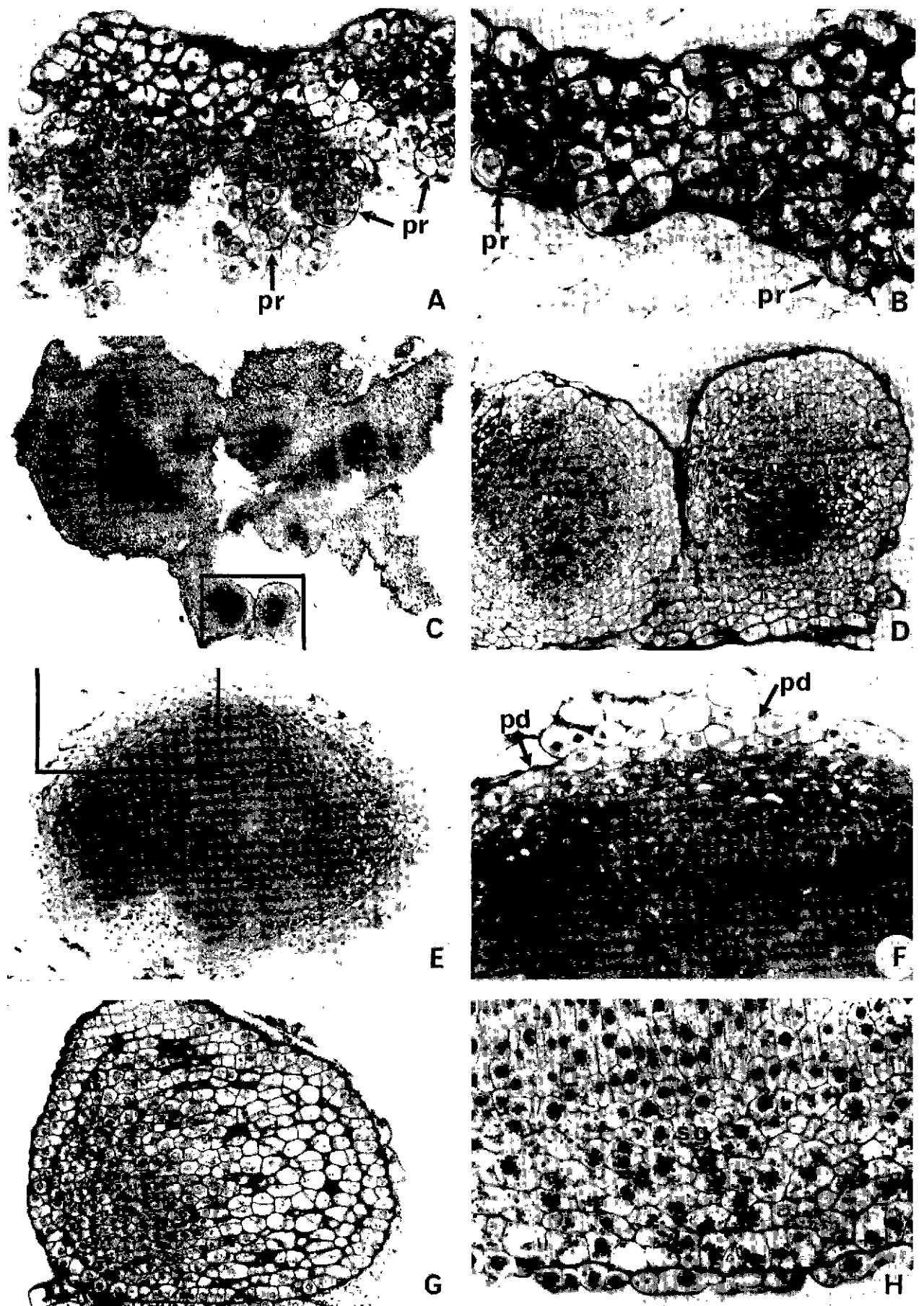


FIG 2 — A - Friable edge of callus showing attempts at embryogenesis. $\times 4$ B - Numerous degenerating proembryos (pr) of unicellular origin. $\times 200$ C - Callus displaying a large number of meristematic centres. $\times 33$ D - Higher magnification of part of the same callus. $\times 166$ E - Very meristematic nodule emerging from the surface of the callus, cells with cytoplasm strongly stained by the presence of soluble proteins. $\times 105$ F - Start of protoderm (pd) formation from peripheral cells. $\times 266$ G - Epidermized and polarized nodule at the start of development as a somatic embryo. $\times 111$ H - Accumulation of starch grains (sg) in cells at the base of a polarized nodule. $\times 330$. — (A - Zone périphérique friable du cal, montrant des tentatives d'embryogenèse. $\times 4$ B - Nombreux proembryons (pr) d'origine unicellulaire en voie de dégénérescence. $\times 200$ C - Cal ayant mis en place de multiples foyers méristématiques. $\times 33$ D - E Grossissement supérieur d'une région de ce cal. $\times 166$ E - Nodule très méristématique émergeant à la surface du cal, cellules dont le cytoplasme est intensément coloré par la présence de protéines solubles. $\times 105$ F - Début de mise en place d'un protoderme (pd) à partir de cellules périphériques du nodule précédent. $\times 266$ G - Nodule épidermisé et polarisé à l'origine de futurs embryons somatiques. $\times 111$ H - Grossissement supérieur de G, montrant l'accumulation de grains d'amidon (sg) dans les cellules de la base d'un nodule polarisé. $\times 330$.)

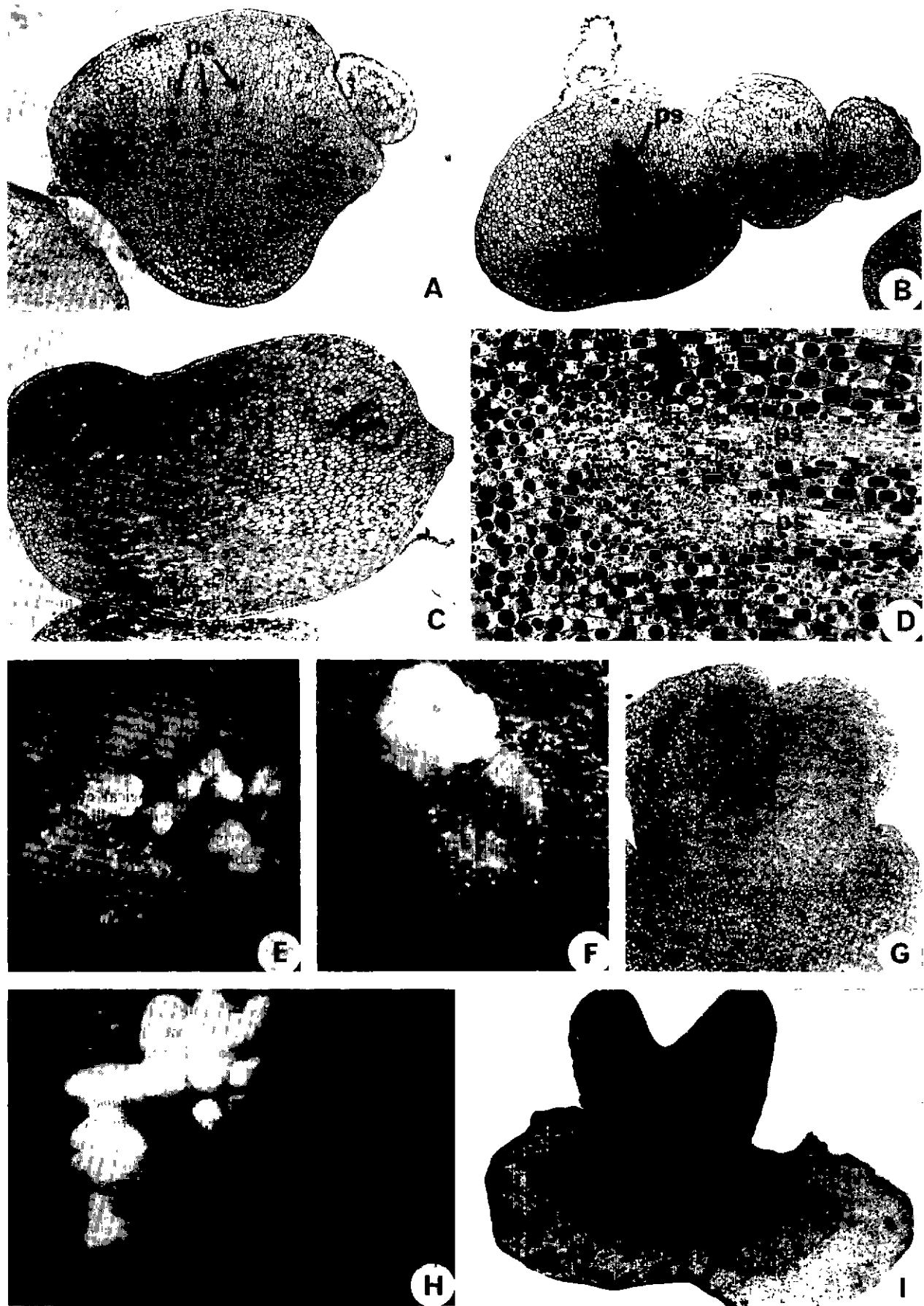


FIG 3. — A - Somatic embryo with provascular strands (ps) growing from the basal meristematic zone. $\times 45$. B - Cross section of three embryogenic nodules at different stages of development $\times 45$. C - Somatic embryo with rich reserves $\times 34$. D - Another view of C, showing a provascular strand and lipid and protein reserves. $\times 160$. E - Callus bearing numerous embryogenic nodules. $\times 4$. F - Embryogenic formation on callus. $\times 10$. G - Cross section of F showing the beginning of adventitious budding. $\times 45$. H - Embryogenic formations separated from the callus and in adventitious proliferation phase on medium containing no growth hormones. $\times 4$. I - Section showing the establishment of a clump of somatic embryos with no shoot and root apices at this stage $\times 27$. — (A - Croissance d'un embryon somatique, avec émission de fibres procumbiales (ps), à partir de la zone méristématique basale. $\times 45$. B - Section de trois nodules embryogènes, à divers stades de développement. $\times 45$. C - Embryon somatique très riche en réserves. $\times 34$. D - Grossissement supérieur de C, montrant une fibre procumbiale et les réserves lipidiques et protéiques. $\times 160$. E - Cal portant de nombreux nodules embryogènes. $\times 4$. F - Formation embryogène sur cal $\times 10$. G - Section de F, montrant le début de la phase d'embryogenèse adventive $\times 45$. H - Formations embryogènes isolées du cal et en phase de prolifération adventive sur milieu sans hormones de croissance. $\times 4$. I - Section montrant la mise en place d'un bouquet d'embryons somatiques dépourvus, à ce stade de développement, d'apex caulinaire et racinaire $\times 27$)

in *Citrus sinensis* and *Aesculus hippocastanum* respectively the presence in the cell wall of vesicles whose contents may cause gelling of the middle lamella under the general dependence of auxins according to Halperin and Jensen (1967). In the oil palm, the embryogenic cells rapidly undergo one or two internal divisions, giving rise to proembryos with two or four cells but which do not develop further.

Their inability to continue to develop can be seen to a certain extent in context with the presence of 2,4-D in the medium, but the stoppage may be physical as at this stage the nodules are still set in the coating of membranes of peripheral cells. This makes the callus relatively compact, which is possibly incompatible with the formation of embryos of unicellular origin which can only evolve in a friable callus. In the latter case, numerous proembryos become established at the edges of the callus or around the internal gaps resulting from its dislocation. They are obviously of unicellular origin but are nevertheless unable to progress beyond a few internal divisions before degenerating. 2,4-D is certainly the most effective inducer of embryogenic potential (Ammirato, 1983). However, although this synthetic auxin undeniably enhances the initiation of embryogenic cells and then of proembryos, it subsequently acts as a potential inhibitor of future development of the latter at different stages of ontogenesis depending on the species. This was observed in rice (Chen *et al.*, 1985), wheat (Carman *et al.*, 1988), maize (Vasil *et al.*, 1985) and sugar cane (Guiderdoni and Demarly, 1988). Maintaining oil palm embryos in the culture conditions used for embryogenesis induction can be considered as one of the main factors responsible for the failure of the potential unicellular process.

Numerous meristematic sites appear in embryogenic calli. The embryogenic formations which develop from these sites in the oil palm under the culture conditions perfected for regeneration from nodular calli form the start of somatic embryos. The cytological characteristics of the cells which form these meristematic centres (Fig. 1H) show that they are very similar to those resulting from the first divisions of a zygote or the first stages of development of a somatic proembryo (in particular in rice, Jones and Rost, 1989a, b). Reynolds and Murashige (1979) found these centres in date palm; they were found to differentiate into organized structures when allowed to develop in a medium lacking growth-regulator supplements. Tisserat and DeMason (1980) considered that in this species « single cells located in both the epidermal and sub-epidermal portions of the aggregate clumps were the precursors to the meristematic loci and embryoids ». According to Brackpool *et al.* (1986), « in coconut, date and oil palm, the onset of embryogenic competency is recognized by the presence of areas of highly meristematic-type cells ». In the oil palm, their siting inside the callus (Fig. 2C) may indicate a different origin to that recognized in the date palm.

We have previously demonstrated in the oil palm (Schwendiman *et al.*, 1988) that a multicellular complex then takes over; this is in the form of whitish nodules consisting of several thousand cells displaying numerous mitotic stages and extremely dense cytoplasm. When covered with epiderm, these masses are white, smooth and pearly. Fernandez *et al.* (1985) utilized immunorecognition systems and no evidence was found for single cell origin. Likewise, Jones and Hughes (1989) « ... believe that the embryoids originate not from single cells, but from multicellular masses within the callus, having continuity with the active meristematic centres found in the callus ».

The establishment of polarity is visible from the first division of a zygote or of a somatic embryogenic cell, as has been shown by Nomura and Komamine (1986) in carrot. This polarity also exists when a group of cells cooperates in embryogenic development (Williams and Maheswaran, 1986). We have detected this histologically in the oil palm when the multicellular mass becomes isolated by the formation of an epidermis. It is therefore « late » and may involve processes which are more difficult to effect in a set of cells rather than in unicellular origin.

Under the culture conditions used here, epidermized embryogenic formation goes through a phase of multiplication by adventitious budding, which appears to be closely related to the presence of 2,4-D. Such a phenomenon is often observed *in vitro* in monocotyledons like *Palmaceae* (Nwankwo and Krikorian, 1983; Guerra and Handro, 1988) and other families and in particular the *Gramineae*: sugar cane (Nadar *et al.*, 1978; Guiderdoni and Demarly, 1988), maize (McCain and Hodges, 1986), *Dactylis* (McDanel *et al.*, 1982).

We have described here the histological events which occur during regeneration of nodular calli of somatic embryos of multicellular origin. This process involves the formation of complex embryogenic structures from highly meristematic centres. However, proembryos of unicellular origin developing from isolated embryogenic cells undergoing several internal divisions were also found.

It can be considered that the modifications in the culture conditions and in particular earlier withdrawal of auxins might enhance this embryogenic procedure. It would then be possible to obtain isolated somatic embryos, whereas today the usual method for oil palm is the obtaining of complex masses formed of embryos at different stages of development.

Acknowledgements. — The authors thank T. Durand-Gasselin and the Laboratoire de Multiplication Végétative, La Mé Research Station (Côte-d'Ivoire) for preparing and providing the plant material for histological investigation and J. Escoute for photographs and technical assistance.

REFERENCES

- [1] AHEE J., ARTHUIS P., CAS G., DUVAL Y., GUENIN G., HANOWER J., HANOWER P., LIEVOUX D., LIÖRET C., MALAURIE B., PANNETIER C., RAILLOT D., VARECHON C. and ZUCKERMAN L. (1981) — La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique. *Oléagineux*, 3, p 113-118.
- [2] AMMIRATO P. V. (1983). — Embryogenesis p. 82-123 In *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 1, eds D. A. Evans, P. V. Ammirato and Y. Yamada 970 p Macmillan, New-York
- [3] BLAKE J. (1983) — Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm, p. 29-50. In *Tissue Culture of Trees*, ed J. H. Dodds, 147 p Croom Helm, London
- [4] BRACKPOOL A. L., BRANTON R. L. and BLAKE J. (1986) — Regeneration in Palms, p 207-222. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants*, vol. 3, ed I. K. Vasil, 512 p Academic Press, London.
- [5] BRANTON R. L. and BLAKE J. (1983). — Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany*, 52, p 673-678.

- [6] BUTTON J, KOCHBA J and BORMAN C H (1974) — Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of «Shamouti» orange (*Citrus sinensis* Osb) *Journal of Experimental Botany*, **25**, p. 446-457
- [7] CARMAN J. G., JEFFERSON N. E. and CAMPBELL W. F. (1988). — Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. I. Quantification of genotype and culture medium effects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **12**, p. 83-95.
- [8] CHEN T. H., LAM L. and CHEN S. C. (1985) — Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **4**, p. 580-587.
- [9] DURAND-GASSELIN T., LE GUEN V., KONAN K. and DUVAL Y. (1989) — Oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. plantations in Côte-d'Ivoire, obtained through *in vitro* culture, first results. In *Proceedings of International Conference of Palms and Palm Products*, NIFOR, Benin City, Nigeria in press.
- [10] DUVAL Y., DURAND-GASSELIN T., KONAN K. and PANNETIER C. (1988) — Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par culture *in vitro*. Stratégies et résultats. *Oléagineux*, **43**, p. 39-47.
- [11] FERNANDINO D., HULME J. H. and HUGHES W. A. (1985). — Oil palm embryogenesis: a biochemical and morphological study, p. 135-150. In *Experimental Manipulation of Ovale Tissue*, eds G. P. Chapman, S. H. Mantell and R. W. Daniels. 256 p. Longman, New York
- [12] FISHER D. B. (1968). — Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, **16**, p. 92-96
- [13] GUERRA M. P. and HANDRO W. (1988) — Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart (Palmae) *Plant Cell Reports*, **7**, p. 550-552
- [14] GLIDERDONI E. and DEMARLY Y. (1988) Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **14**, p. 71-88
- [15] HALPERIN W. and JENSEN W. A. (1967) — Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *Journal of Ultrastructural Research*, **18**, p. 428-443
- [16] HANOWER J. and PANNETIER C. (1982) — *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq., p. 745-746. In *Plant Tissue Culture 1982*, ed. A. Fujiwara. 839 p. Maruzen Tokyo
- [17] JONES L. H. and HUGHES W. A. (1989) — Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), p. 176-202. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 5, *Trees II*, ed. Y. P. S. Bajaj, 622 p. Springer-Verlag, Berlin
- [18] JONES T. J. and ROST T. L. (1989a). — The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Botanical Gazette*, **150**, p. 41-49
- [19] JONEST J. and ROST T. L. (1989b) — Histochemistry and ultrastructure of rice (*Oryza sativa* L.) zygotic embryogenesis. *American Journal of Botany*, **76**, p. 504-520
- [20] KRİKORIAN A. D. and KANN R. (1986) — Oil palm improvement via tissue culture. *Plant Breeding Review*, **4**, p. 175-202.
- [21] Mc CAIN J. W. and HODGES T. K. (1986) — Anatomy of somatic embryos from maize embryo cultures. *Botanical Gazette*, **147**, p. 453-460
- [22] Mc DANIEL J. K., CONGER B. V. and GRAHAM E. T. (1982) — A histological study of tissue proliferation, embryogenesis, and organogenesis from tissue culture of *Dactyloctenium aegyptium* L. *Protoplasma*, **110**, p. 121-128
- [23] NADAR H. M., SOEPRAPTOPO S., HEINZ D. J. and LADD S. L. (1978). — Fine structure of sugarcane (*Saccharum* sp.) callus and the role of auxin in embryogenesis. *Crop Science*, **18**, p. 210-216.
- [24] NOMURA B. K. and KOMANINE A. (1986) — Polarized DNA synthesis and cell division in cell clusters during somatic embryogenesis from single carrot cells. *The New Phytologist*, **104**, p. 25-32.
- [25] NWANKWO B. A. and KRİKORIAN A. D. (1983). — Morphogenetic potential of embryo- and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. *Annals of Botany*, **51**, p. 65-76.
- [26] PANNETIER C. and BUFFARD-MOREL J. (1982). — Production of somatic embryos from leaf tissues of coconut *Cocos nucifera* L., p. 755-756. In *Plant Tissue Culture 1982*, ed. A. Fujiwara. 839 p. Maruzen, Tokyo
- [27] PANNETIER C. and BUFFARD-MOREL J. (1986). — Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) p. 430-450. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry I, Trees I*, ed. Y. P. S. Bajaj, 515 p. Springer-Verlag, Berlin
- [28] PANNETIER C., ARTHUIS P. et LIEVOUX D. (1981) — Néoformations de jeunes plants d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oléagineux*, **36**, p. 119-122.
- [29] PARANJOTHY K. (1984) — Oil Palm, p. 519-605. In *Handbook of Plant Cell Culture* vol. 3, eds P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp and Y. Yamada, 620 p. Macmillan, New York.
- [30] PROFUMO P., GASTALDO P. and RASCIONO J. (1987). — Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. *Protoplasma*, **138**, p. 89-97
- [31] RABECHAU H. et MARTIN J. P. (1976). — Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences de Paris*, **283**, p. 1735-1737
- [32] REYNOLDS J. F. and MURASHIGE T. (1979) — Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In Vitro*, **15**, p. 383-387
- [33] SCHWENDIMAN J., PANNETIER C. and MICHAUX-FERRIÈRE N. (1988) — Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany*, **62**, p. 43-52
- [34] TISSERAT and DEMASON D. A. (1980) — A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany*, **46**, p. 465-472
- [35] VASIL V., LU C. Y. and VASIL I. K. (1985) — Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Protoplasma*, **127**, p. 1-8.
- [36] WETHERELL D. F. (1984) — Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **3**, p. 221-227.
- [37] WILLIAMS E. G. and MAHESWARAN G. (1986) — Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, **57**, p. 443-462

RÉSUMÉ

Histologie des formations embryogènes obtenues au cours de la culture *in vitro* du palmier à huile *Elaeis guineensis* Jacq.

J. SCHWENDIMAN, C. PANNETIER, N. MICHAUX-FERRIÈRE, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 10, p. 409-418.

L'analyse histologique a été particulièrement centrée sur la formation et l'évolution des cellules et des nodules embryogènes au cours de la multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile. Les cals primaires isolés des explants prolifèrent sur un milieu contenant du 2-4 D, des cytokinines et du charbon actif. Lorsque les conditions de culture sont favorables, la zone pseudo-cambiale qui assure la prolifération des cals nodulaires devient embryogène. Cette modification histologique est décrite. Des cellules embryogènes s'isolent, spécialement à la périphérie des cals, elles subissent un ou deux reclonnements internes, mais les proembryons ainsi formés n'évoluent pas ultérieurement. L'arrêt de ce processus d'origine unicellulaire est discuté. L'évolution des cals se fait à partir des nombreux foyers méristématiques qui s'y forment. Ces foyers sont constitués par des cellules très actives possédant des caractères spéciaux qui sont décrits. Suite à l'activité de ces foyers, des petits nodules blanchâtres émergent. Ils s'isolent en formant un épiderme, se polarisent et donnent naissance à des embryons somatiques. A ce stade, ils sont transférés sur un milieu sans hormones de croissance sur lequel se déroule une embryogenèse adventive. Le processus d'embryogenèse somatique du palmier à huile, d'origine multicellulaire, est comparé avec celui décrit au niveau histologique pour d'autres Palmacées.

RESUMEN

Histología de las formaciones embriogénicas obtenidas en el cultivo *in vitro* de la palma africana *Elaeis guineensis* Jacq.

J. SCHWENDIMAN, C. PANNETIER, N. MICHAUX-FERRIÈRE, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 10, p. 409-418

El análisis histológico se ha orientado particularmente hacia la formación y la evolución de las células y de los nódulos embriogénicos durante la propagación vegetativa *in vitro* de la palma africana. Los callos primarios aislados de los explantes proliferan en un medio que contiene 2-4 D, citoquininas y carbón activo. En unas condiciones propicias de cultivo, el área de pseudocambium que proporciona la proliferación de los callos nodulares viene a ser embriogénico. Se describe esta modificación histológica. Unas células embriogénicas se aíslan, principalmente en la periferia de los callos, sufriendo una o dos nuevas formaciones de paredes internas, pero los proembriones así formados dejan de evolucionar más adelante. Se discute la interrupción de este proceso de origen unicelular. Los callos evolucionan a partir de muchos focos meristemáticos que allí se forman. Estos focos son formados por células muy activas que tienen caracteres especiales que se describen. A raíz de la actividad de estos focos surgen pequeños nódulos blancuzcos. Se aíslan formando una epidermis, polarizándose y generando embriones somáticos. En esta etapa se transfieren a un medio sin hormonas de crecimiento y allí se desarrolla una embriogénesis adventicia. El proceso de embriogénesis somática de la palma africana, de origen multicelular, se compara con el que se describe desde el punto de vista de la histología para otras palmáceas.

Histologie des formations embryogènes obtenues au cours de la culture *in vitro* du palmier à huile *Elaeis guineensis* Jacq.

J. SCHWENDIMAN (1), C. PANNETIER (2), N. MICHAUX-FERRIÈRE (1)

Mots clés : palmier à huile, *Elaeis guineensis*, histologie, embryogenèse somatique, cellules embryogènes

INTRODUCTION

Le palmier à huile africain, *Elaeis guineensis*, est une espèce totalement allogame pour laquelle les méthodes conventionnelles de multiplication végétative ne peuvent pas être utilisées. Les avantages du clonage des meilleurs individus sont évidents et différentes équipes se sont consacrées à la mise au point de procédures destinées à obtenir la régénération du palmier à huile par le biais de l'embryogenèse somatique. Ces recherches ont été publiées par Blake, 1983 ; Paranjothy, 1984 ; Brackpool *et al.*, 1986 ; Krikorian et Kann, 1986 ; Jones et Hughes, 1989.

Les recherches conjointes menées par l'ORSTOM et le CIRAD/IRHO ont permis la mise au point d'une méthode d'obtention de plantules par embryogenèse somatique utilisant comme explants de jeunes folioles. Deux voies d'embryogenèse somatique ont été décrites : celle à partir de cultures friables à croissance rapide (Rabéchaux et Martin, 1976. Ahée *et al.*, 1981) ou celle à partir de cals nodulaires, isolés des explants, et à croissance lente (Pannetier *et al.*, 1981). Afin d'éviter au maximum les risques de variations somaclonales, c'est cette seconde procédure qui a été développée pour la production à grande échelle de plantules (Duval *et al.*, 1988 ; Durand-Gasselin *et al.*, 1989).

L'analyse histologique que nous avons conduite porte sur le procédé d'embryogenèse somatique par les cals nodulaires. Différentes observations ont été publiées sur la structure anatomique des cultures *in vitro* de palmier à huile, de cocotier et de palmier-dattier (Reynolds et Murashige, 1979 ; Tisserat et DeMason, 1980 ; Pannetier et Buffard-Morel, 1982, 1986 ; Nwankwo et Krikorian, 1983 ; Branton et Blake, 1983). Dans une publication antérieure (Schwendiman *et al.*, 1988), nous avons décrit l'analyse histologique des stades successifs permettant chez le palmier à huile d'obtenir des embryons somatiques et des plantules. Toutefois, cette analyse méritait un examen plus approfondi, centré sur les phénomènes qui conduisent à l'apparition des formations embryogènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La méthode développée par l'ORSTOM et le CIRAD/IRHO et appliquée à grande échelle utilise comme explants des fragments de folioles de jeunes feuilles non chlorophylliennes prélevées au sein de la flèche du palmier à huile, sans léser le méristème terminal. Après une période de callogenèse durant laquelle les explants sont maintenus sur un milieu avec auxine, des structures embryogènes sont obtenues par repiquage des cals sur un milieu contenant du 2-4 D, des cytokinines et du charbon actif (Hanower et Pannetier, 1982 ; Duval *et al.*, 1988). Lorsque les formations embryogènes sont bien développées, un milieu sans hormones de croissance va assurer la prolifération des embryons et la phase de développement des plantules. Le laboratoire de Multiplication Végétative de La Mé, Côte-d'Ivoire, a fourni le matériel destiné à l'étude histologique. Les échantillons ont été fixés dans la solution suivante : 50 ml de tampon phosphate ou cacodylate de Na 0,2 M, pH neutre, 20 ml de paraformaldéhyde à 10 %, 4 ml de glutaraldéhyde à 25 %, 1 g de caféine, 26 ml d'eau distillée. Après déshydratation dans une série de bains d'alcool, ils ont été inclus dans l'Historème LKB et sectionnés à 3 micromètres. Diverses colorations ont été utilisées, notamment la

réaction à l'acide périodique-Schiff, associée soit à l'hématoxyline de Régaud, au bleu de toluidine ou au naphthol blue-black spécifique des protéines (Fisher, 1968).

RÉSULTATS

Au cours du processus de culture *in vitro* qui conduit chez le palmier à huile à l'obtention d'embryons somatiques, différentes phases peuvent être reconnues (Schwendiman *et al.*, 1988). Certaines étapes histologiques ne seront rappelées ici que brièvement afin de situer le phénomène sur lequel nous avons particulièrement centré notre analyse : la formation et l'évolution des cellules et des nodules embryogènes.

1. — Callogenèse primaire.

À la suite de la réactivation des cellules périvasculaires des explants foliaires, il se forme des cals internes disposés le long des nervures. Leur croissance est essentiellement assurée par la mise en place d'une zone pseudocambiale consistant en 4 à 5 assises cellulaires. Les divisions mettent en place des files radiales de cellules, qui vers l'extérieur contiennent souvent quelques granules amyloïdes, vers l'intérieur, les cellules sont dépourvues d'amidon et certaines se chargent en composés phénoliques. La prolifération des cals entraîne la dissociation de la structure de la feuille et la rupture de l'épiderme. Les cals visibles à l'œil nu sont alors prélevés et mis en culture sur un second milieu.

2. — Prolifération des cals.

Les cals prolifèrent par suite d'invaginations de la zone pseudocambiale. On obtient ainsi un ensemble de cals nodulaires reliés les uns aux autres. La zone interne de ces nodules est formée de cellules différenciées, certaines pouvant parfois accumuler des polyphénols. À l'extérieur de la zone pseudocambiale, les cellules dégèrent : les nodules sont enrobés dans une gangue de couleur brun clair qui correspond à l'accumulation successive des parois aplaties des cellules mortes. Aucune réserve n'est décelable au sein des cellules. Selon les arbres, et probablement les génotypes utilisés, la prolifération des cals nodulaires peut se prolonger très longtemps (plusieurs années) sans changement notable ni morphologique, ni histologique. Au contraire, dans les cas les plus favorables, des structures nouvelles sont décelables très rapidement (après moins d'un mois de culture).

3. — Origine des formations embryogènes.

Lorsque les cals nodulaires évoluent d'une manière favorable (Fig. 1A, B), on observe histologiquement une modification importante au niveau de la zone pseudocambiale. Celle-ci, auparavant constituée de quelques assises de cellules méristématiques, se transforme progressivement et certainement rapidement, en un ensemble de cellules possédant de nombreux caractères histologiques typiques des cellules embryogènes (Fig. 1C) : un rapport nucléocytoplasmique élevé, avec un gros noyau en position centrale dans la cellule, un nucléole unique et volumineux, très colorable ; un cytoplasme dense peu vacuolisé, intensément coloré en bleu par le naphthol blue-black, indiquant une forte concentration en protéines solubles ; la présence de grains d'amidon, généralement dispersés dans le cytoplasme ; enfin, une gélification de la lamelle moyenne isole les cellules les unes des autres et leur confère un aspect arrondi. D'une manière pratiquement concomitante, ces cellules embryogènes subissent 1 ou parfois 2 reclouonnements internes.

(1) Laboratoire de Cytogénétique, CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

(2) Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA, 78026 Versailles Cedex (France).

Ce processus confère un nouveau statut aux cellules qui constituent auparavant la zone pseudocambiale désormais non reconnaissable. Il semble ensuite gagner l'intérieur des nodules (Fig. 1D), tandis qu'il paraît moins marqué vers l'extérieur, dans les quelques assises cellulaires sous-jacentes à la gangue formée par les membranes. En dehors de leur zone périphérique, les cals nodulaires deviennent progressivement constitués d'un « ensemble » de cellules embryogènes et de proembryons à 2 ou 4 cellules (Fig. 1E, F), isolés les uns des autres par les membranes gélatinées, mais toujours enrobés dans la gangue de parois desquamées. De ce fait, cette modification demeure totalement masquée à l'observateur si celui-ci n'effectue pas de contrôles histologiques.

A ce stade, le cal constitué par un ensemble de nodules embryogènes va subir une importante modification histologique. De nombreux foyers méristématiques (Fig. 1G) répartis d'une manière apparemment aléatoire, se mettent en place au sein du cal. Ces foyers sont remarquables par l'intensité de coloration que prend le cytoplasme des cellules qui les composent (Fig. 1H), cytoplasme très riche en protéines solubles, mais dépourvu de réserves amylicées. Les noyaux sont très volumineux, de forme arrondie, et contiennent 1 ou 2 nucléoles intensément colorés. Les cellules se divisent activement et de nombreuses figures de mitoses sont visibles.

Au voisinage immédiat de ces foyers, les cellules conservent leur état embryogène précédent, que l'on reconnaît notamment par la présence de granules amylicés dispersés dans leur cytoplasme. On remarque, surtout en allant vers la périphérie du cal, une tendance de ces cellules embryogènes à s'isoler et à subir quelques recloisonnements internes leur conférant l'aspect de proembryons (Fig. 2A). Toutefois, cette tentative ne paraît pas capable de se poursuivre au-delà de quelques divisions et de ce fait, on constate que les cellules constituant les proembryons se vacuolisent, perdent leurs réserves amylicées et finalement dégèrent (Fig. 2B).

L'évolution ultérieure du cal va être assurée à partir des foyers méristématiques qui s'y sont formés (Fig. 2C). Suite aux divisions cellulaires extrêmement nombreuses qui se produisent, le cal perd de sa compacité et à sa surface, des petits nodules (Fig. 2D) de couleur blanchâtre vont émerger de la gangue formée par les parois des cellules mortes qui le recouvrait auparavant.

4. — Développement ultérieur des formations embryogènes.

Ces nodules sont constitués par un massif de plusieurs milliers de cellules méristématiques étroitement accolées les unes aux autres (Fig. 2E). Elles sont dépourvues de réserves amylicées, mais possèdent un cytoplasme dense très riche en protéines de réserves. En allant vers la périphérie, les granules protéiques nombreux et petits tendent à devenir plus volumineux et moins nombreux. Ces massifs cellulaires s'isolent par la mise en place d'un protoderme (Fig. 2F), puis d'un véritable épiderme. Une ou deux assises cellulaires périphériques se différencient, réduction du volume nucléaire, perte de l'activité nucléolaire et surtout disparition des réserves protéiques, qui restent par contre très conséquentes dans les couches cellulaires immédiatement sous-jacentes. Certaines cellules périphériques se vacuolisent et seront certainement exfoliées.

La mise en place d'un véritable épiderme va ultérieurement isoler le nodule, et paraît prélude à une polarité qui s'établit au sein de celui-ci (Fig. 2G). Histologiquement, la polarité se traduit par une répartition différentielle des granules amylicés, essentiellement cantonnés à la base des futurs embryons somatiques (Fig. 2H). La région inférieure du nodule est constituée de cellules méristématiques, à partir desquelles vont se mettre en place des faisceaux de fibres procambiales dont les divisions vont accompagner la croissance des embryons (Fig. 3A, B). D'autres réserves, lipidiques et protéiques, s'accumulent et vont devenir de plus en plus conséquentes (Fig. 3C, D), tandis que la formation de granules amylicés pratiquement cessé. Durant cette phase d'organisation et de croissance, les formations embryogènes (Fig. 3E) deviennent aisément reconnaissables des cals sous-jacents par leur aspect compact, lisse, blanc-nacré dû à la présence d'un épiderme (Fig. 3F, G).

Les structures embryogènes vont croître intensément, des dômes, visibles à l'œil nu, deviendront des embryons somatiques. A ce stade, les formations embryogènes sont isolées du cal sous-jacent pour être cultivées sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance : un phénomène de prolifération se met en place et on obtient une culture constituée d'un ensemble complexe de formations embryogènes et d'embryons somatiques à différents stades de développement (Fig. 3H, I). La prolifération continue de cette culture permet la production d'un grand nombre de plantules.

DISCUSSION

La culture *in vitro* du palmier à huile, destinée à obtenir la multiplication végétative des meilleurs génotypes, rencontre un

certain nombre de contraintes. La phase la plus importante est celle de l'induction des cellules embryogènes. Elle prend place au sein des cals nodulaires isolés de l'explant et en phase de prolifération. Elle concerne d'abord les cellules méristématiques de la zone pseudocambiale, et elle s'étend ensuite aux cellules parenchymateuses qui constituent la zone interne des nodules. Toutefois, faute de coupes histologiques bien échelonnées dans le temps, on ne peut exclure la possibilité que les cellules embryogènes nouvellement formées soient issues des divisions actives des cellules qui constituaient auparavant la zone pseudocambiale. Il existe une relative synchronie de la formation des cellules embryogènes pour la plupart des nodules constitutifs d'un cal d'un même tube à essais. Ceci suggère qu'une adéquation a lieu à un certain moment entre les cals nodulaires en prolifération et les conditions physico-chimiques de la culture.

L'une des premières manifestations histologiques de l'induction embryogène est la gélification de la lamelle moyenne. Ceci traduit un processus d'isolement physique (et probablement physiologique) pouvant selon Wetherell (1984) supprimer l'effet répressif de l'embryogénèse dû aux cellules avoisinantes. Button *et al.* (1974) chez *Citrus sinensis*, Profumo *et al.* (1987) chez *Aesculus hippocastanum* constatent dans la paroi cellulaire l'existence de vésicules dont le contenu serait responsable de cette gélification de la lamelle moyenne, sous la dépendance générale des auxines selon Halperin et Jensen (1967). Chez le palmier à huile, les cellules embryogènes subissent rapidement un ou deux recloisonnements internes qui donnent naissance à des proembryons de 2 ou 4 cellules, mais qui n'iront pas au-delà dans leur développement.

Leur incapacité à poursuivre le développement amorcé se conçoit dans une certaine mesure par la présence du 2-4 D dans le milieu, mais cet arrêt est peut-être essentiellement physique dans la mesure où à ce stade, les nodules demeurent encore enrobés dans la gangue constituée par les membranes des cellules périphériques. Ceci confère certainement au cal une relative compacité, qui est peut-être incompatible avec la formation d'embryons d'origine unicellulaire, dont l'évolution ne peut s'accomplir qu'au sein d'un cal friable. Lorsque tel est le cas, de nombreux proembryons s'établissent à la périphérie du cal ou autour des lacunes internes dues à sa dislocation. Ils sont manifestement d'origine unicellulaire, mais sont toutefois incapables d'aller au-delà de quelques recloisonnements internes avant de dégérer. Le 2-4 D est certainement l'inducteur le plus efficace du potentiel embryogène (Ammirato, 1983). Toutefois, si cet analogue auxinique favorise indéniablement l'initiation de cellules embryogènes, puis de proembryons, il agit ensuite sur ces derniers comme un inhibiteur potentiel de leur développement ultérieur et ce à différents stades de leur ontogenèse selon les espèces. Ceci a été constaté chez le riz (Chen *et al.*, 1985), le blé (Carman *et al.*, 1988), le maïs (Vasil *et al.*, 1985) et la canne à sucre (Guiderdoni et Demarly, 1988). En conséquence, le maintien des embryons de palmier à huile dans les conditions de culture nécessaires à l'induction de l'embryogénèse est certainement l'un des principaux facteurs responsables de l'échec de l'origine unicellulaire potentielle.

Dans les cals embryogènes, de nombreux sites méristématiques apparaissent, les formations embryogènes qui se développent à partir de ces sites constituent chez le palmier à huile, et dans les conditions de culture mises au point pour la régénération à partir de cals nodulaires, l'origine des embryons somatiques. Les cellules (Fig. 1H) constitutives de ces centres méristématiques sont remarquables par leurs caractéristiques cytologiques qui les apparentent très étroitement à celles issues des premières divisions d'un zygote ou des premiers stades de développement d'un proembryon somatique (voir notamment chez le riz, Jones et Rost, 1989a, b). Reynolds et Murashige (1979) ont reconnu chez le palmier-dattier la présence de ces centres qui se différencient en structures organisées lorsqu'on leur permet de se développer sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance. Chez cette espèce, pour Tisserat et DeMason (1980) « *single cells located in both the epidermal and sub-epidermal portions of the aggregate clumps were the precursors to the meristematic loci and embryoids* ». Selon Brackpool *et al.* (1986) « *in coconut, data and oil palm, the onset of embryogenic competency is recognized by the presence of areas of highly meristematic-type cells.* » Chez le palmier à huile, leur localisation à l'intérieur du cal (Fig. 2C) pourrait indiquer une origine différente de celle reconnue pour le palmier-dattier.

Chez le palmier à huile, nous avons précédemment démontré (Schwendiman *et al.*, 1988) que le relais est alors pris par un complexe pluricellulaire, sous la forme de nodules blanchâtres formés de plusieurs milliers de cellules montrant de nombreuses figures de mitoses et dont le cytoplasme est extrêmement dense. Lorsqu'elles s'épidermisent, ces masses apparaissent blanches et lisses. Fernandez *et al.* (1985), utilisant des systèmes de reconnaissance immunologique, n'ont trouvé aucune évidence en faveur d'une origine unicellulaire. De même, Jones et Hughes (1989) « *believe that the embryoids originate not from single cells, but from multicellular*

masses within the callus, having continuity with the active meristematic centres found in the callus».

L'établissement d'une polarité est visible dès la première division d'un zygote ou d'une cellule embryogène somatique comme l'ont montré Nomura et Komanine (1986) chez la carotte. Cette polarité existe aussi lorsqu'un groupe de cellules coopère dans le développement embryogène (Williams et Maheswaran, 1986). Sur le palmier à huile, nous ne l'avons histologiquement décelée que lorsque le massif pluricellulaire s'est isolé suite à la formation d'un épiderme. Elle est donc « tardive » et peut impliquer la mise en place d'événements plus difficiles à mettre en œuvre sur tout un ensemble de cellules comparativement à ceux nécessaires dans le cadre d'une origine unicellulaire.

Avec nos conditions de culture, les formations embryogènes vont subir une phase de multiplication par bourgeonnement adventif qui semble en étroite relation avec la présence de 2-4 D. *In vitro*, un tel phénomène est fréquemment constaté chez les Monocotylédones, qu'il s'agisse de *Palmaçées* (Nwankwo et Krikorian, 1983 ; Guerra et Handro, 1988) ou d'autres familles notamment les *Graminées* : canne à sucre (Nadar *et al.*, 1978 ; Guiderdoni et Demarly, 1988), maïs (McCain et Hodges, 1986), *Dactylis* (McDaniel *et al.*, 1982).

Nous avons décrit ici les événements histologiques qui ont lieu au cours de la régénération, à partir de cals nodulaires, d'embryons somatiques d'origine multicellulaire. Cette voie d'obtention passe par la formation de structures embryogènes complexes issues de la mise en place de foyers très méristématiques. Cependant, des proembryons d'origine unicellulaire ont aussi été mis en évidence à partir de cellules embryogènes ayant subi quelques recloisonnements internes.

On peut penser que des modifications des conditions de culture et en particulier, la suppression des auxines de façon précoce, pourrait permettre de favoriser cette voie d'embryogenèse. Il serait possible d'obtenir des embryons somatiques isolés, alors qu'actuellement le schéma typique sur le palmier à huile est l'obtention de masses complexes constituées d'embryons à différents stades de développement.

Remerciements. — Les auteurs remercient T. Durand-Gasselin et le laboratoire de Multiplication Végétative, Station de Recherche de La Mé (Côte-d'Ivoire) pour la préparation et la fourniture du matériel végétal destiné à l'analyse histologique et J. Escoute pour les photographies et l'assistance technique.

EQUIP
SCOA
groupe

CONFORT
AMEUBLEMENT
ART MÉNAGER
ELECTROMÉNAGER

TECHNIQUE
CLIMATISATION - FROID
EQUIPEMENT POUR COLLECTIVITES

QUINCOA
TOUT L'OUTILLAGE PROFESSIONNEL
LE BRICOLAGE
LE SANITAIRE

ZONE 3
TEL 35 61 06
35 62 03

PLATEAU
TEL 32 20 30
32 96 01

BOULEVARD DE MARSEILLE
BOULEVARD DE LA PAIX
BOULEVARD DE LA LIBÉRATION
BOULEVARD DE LA RÉPUBLIQUE
BOULEVARD DE LA VICTOIRE
BOULEVARD DE LA DÉMOCRATIE
BOULEVARD DE LA JUSTICE
BOULEVARD DE LA SÉRIÉ
BOULEVARD DE LA TRAVAIL
BOULEVARD DE LA CULTURE
BOULEVARD DE LA SCIENCE
BOULEVARD DE LA SANTÉ
BOULEVARD DE LA BEAUTÉ
BOULEVARD DE LA FORTUNE
BOULEVARD DE LA PROSPÉRIÉTÉ
BOULEVARD DE LA SÉCURITÉ
BOULEVARD DE LA PAIX
BOULEVARD DE LA LIBÉRATION
BOULEVARD DE LA RÉPUBLIQUE
BOULEVARD DE LA VICTOIRE
BOULEVARD DE LA DÉMOCRATIE
BOULEVARD DE LA JUSTICE
BOULEVARD DE LA SÉRIÉ
BOULEVARD DE LA TRAVAIL
BOULEVARD DE LA CULTURE
BOULEVARD DE LA SCIENCE
BOULEVARD DE LA SANTÉ
BOULEVARD DE LA BEAUTÉ
BOULEVARD DE LA FORTUNE
BOULEVARD DE LA PROSPÉRIÉTÉ
BOULEVARD DE LA SÉCURITÉ

OUVERT LES SAMEDIS APRES-MIDI. LIVRAISON A DOMICILE

EQUIP Vos Equiptiers Conseil