

Développement de la cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile, avec un procédé amélioré

Development of cryopreservation for oil palm somatic embryos using an improved process

D. DUMET⁽¹⁾, F. ENGELMANN⁽¹⁾, N. CHABRILLANGE⁽¹⁾, F. RICHAUD⁽¹⁾,
T. BEULE⁽¹⁾, T. DURAND-GASSELIN⁽²⁾ et Y. DUVAL⁽¹⁾

Résumé. — Un nouveau procédé de cryoconservation comprenant une étape de dessiccation au silicagel avant la congélation dans l'azote liquide a été développé pour les embryons somatiques standards de palmier à huile. Il a été appliqué avec succès en France et en Côte-d'Ivoire à 39 clones différents. La survie après cryoconservation a été obtenue avec tous les clones, avec des taux variant entre 2 et 100%. Les clones ayant un aspect morphologique normal ont présenté un taux de survie significativement plus élevé (34% en moyenne) que ceux en mauvais état physiologique (12% en moyenne). La cryoconservation est maintenant appliquée en routine aux embryons somatiques de palmier à huile avec ce procédé amélioré.

Mots clés. — Palmier à huile, embryons somatiques, cryoconservation, dessiccation, silicagel.

Abstract. — A new cryopreservation process, including a desiccation step with silica gel prior to freezing in liquid nitrogen was developed with standard oil palm somatic embryos. It was successfully applied in France and Ivory Coast to a total of 39 different clones. Survival after cryopreservation was obtained with all clones and ranged between 2 and 100%. Clones displaying a normal morphological aspect had a significantly higher survival rate (average of 34%) than those in a poorer condition (average of 12%). Cryopreservation is now routinely applied with oil palm somatic embryos using this improved procedure.

Key words. — Oil palm, somatic embryos, cryopreservation, desiccation, silica gel.

INTRODUCTION

Les recherches pour le développement d'un procédé de cryoconservation pour les embryons somatiques de palmier à huile ont débuté en 1984, lorsque les laboratoires produisant des clones à grande échelle ont été confrontés à des problèmes de gestion dus au nombre croissant de clones créés. La cryoconservation (conservation dans l'azote liquide, -196 °C) est à l'heure actuelle la seule méthode permettant d'assurer la conservation à long terme des ressources génétiques végétales. Un protocole de cryoconservation a été mis au point (Engelmann *et al.*, 1985) qui comprenait les étapes suivantes :

- production d'un type particulier d'embryons, des embryons fusiformes, par une culture de deux mois sur un milieu contenant 0,3M de saccharose (Engelmann et Dereuddre, 1988) ;
- prétraitement de 7 jours sur un milieu contenant 0,75M de saccharose ;
- congélation rapide suivie d'un réchauffement rapide ;
- reprise sur des milieux progressivement appauvris en saccharose, additionnés d'une faible quantité d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) ;

(1) ORSTOM/CIRAD - Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, BP 5035 - 34032 Montpellier cedex (France)

(2) CIRAD-CP, IDEFOR-DPO, station principale de La Mé, 13 BP 989 Abidjan 13, (Côte-d'Ivoire)

INTRODUCTION

Research for the development of a cryopreservation process for oil palm somatic embryos started in 1984, when laboratories producing clonal oil palms on a large scale were faced with management problems induced by the increasing number of clones produced. Cryopreservation (storage in liquid nitrogen, -196 °C) is the only current method allowing long-term conservation of plant germplasm. A cryopreservation protocol was set up (Engelmann *et al.*, 1985) which comprized the following successive steps:

- production of a particular type of material, finger shaped embryos, by a two-month culture on a medium supplemented with 0.3M sucrose (Engelmann and Dereuddre, 1988);
- pretreatment for 7 days on a medium containing 0.75M sucrose;
- rapid freezing in liquid nitrogen followed by rapid thawing;
- recovery on media with progressively lowered sucrose concentrations, supplemented with a low concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D);

(1) ORSTOM/CIRAD - Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, BP 5035 - 34032 Montpellier cedex (France)

(2) CIRAD-CP, IDEFOR-DPO, station principale de La Mé, 13 BP 989 Abidjan 13, (Ivory Coast)

ORSTOM Fonds Documentaire

29 OCT. 1993

N° 38.622 ex 1
Cote B M P 36

- repiquage sur milieu standard dépourvu de régulateurs de croissance pour la multiplication des embryons et la production de pousses feuillées, suivant le procédé ORSTOM/IRHO standard (Pannetier *et al.*, 1981).

Ce procédé de cryoconservation a été expérimenté avec succès à grande échelle puisqu'un total d'environ 150 clones a été congelé en Indonésie, Malaisie, Côte d'Ivoire et France (Engelmann, 1991a). Des embryons ont pu être stockés pendant 52 mois dans l'azote liquide sans modification de leur taux de survie (Engelmann, 1992). Plusieurs centaines de palmiers provenant d'embryons congelés ont été plantés en champ à la station de recherche de La Mé (Côte-d'Ivoire). Aucune différence n'a été notée dans leur développement végétatif et floral en comparaison avec des palmiers issus d'embryons témoins non congelés (Durand-Gasselino, résultats non publiés). Cependant, le développement en routine de cette technique s'est trouvé considérablement ralenti par la production faible et aléatoire d'embryons fusiformes qui étaient alors les seules structures capables de résister à la congélation (Engelmann, 1991a).

Des progrès importants ont été réalisés par rapport au procédé original en ajoutant une étape de déshydratation des embryons avec du silicagel après leur prétraitement sur milieu enrichi en sucre et avant leur congélation dans l'azote liquide (Dumet *et al.*, 1993). En effet, cela a permis de congeler des embryons standards, supprimant ainsi la limitation imposée par la faible production d'embryons fusiformes mentionnée précédemment. De plus, la reprise de prolifération après le réchauffement s'est avérée généralement plus élevée et rapide, atteignant dans certains cas 100% des embryons congelés.

Dans cet article, nous décrivons les résultats obtenus en appliquant cette nouvelle technique à un nombre important de clones. Les essais ont été réalisés à l'ORSTOM/Montpellier et à l'IDEFOR-DPO (Côte-d'Ivoire).

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Les clones d'embryons somatiques utilisés dans cette étude provenaient de palmiers hybrides (Deli x La Mé) adultes.

Méthodes

Les embryons somatiques ont été produits selon la méthode de Pannetier *et al.* (1981). Les cultures ont été maintenues sur un milieu standard dépourvu de régulateurs de croissance à 27 ± 1 °C, avec une photopériode de 12 heures sur 24 et une énergie lumineuse de $30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Les repiquages ont été effectués mensuellement.

Pour la cryoconservation, des massifs d'embryons pesant 200-300 mg (Fig. 1) ont été disséqués dans les cultures standards. Ils ont été placés pendant 7 jours (5 massifs par boîte de Petri de 55 mm) sur un milieu contenant 0,75M de saccharose. Les massifs d'embryons ont été ensuite transférés dans des boîtes de Petri en verre (55 mm) placées dans des boîtes étanches contenant du silicagel pour leur dessiccation. Deux types de boîtes ont été utilisés : des boîtes en verre de 150 ml ou des boîtes en polypropylène de 500 ml. Les boîtes en verre contenaient 40 g de silicagel et celles en polypropylène 80 g. Tous ces récipients étaient autoclavés et le silicagel régénéré pendant 4-5 heures dans une étuve thermostatée à 150 °C entre deux essais successifs. Les boîtes étanches contenant les embryons ont été placées à l'obscurité à 27 °C pendant 16 heures. Les embryons déshydratés ont été transférés dans des cryotubes stériles (5 massifs par cryotube de 2 ml) et congelés par immersion directe des cryotubes dans l'azote liquide. Après un minimum d'une

- *transfer onto standard medium devoid of growth regulators for multiplication of embryos and production of plantlets, according to the standard ORSTOM/CIRAD process (Pannetier et al., 1981).*

This cryopreservation process was experimented successfully on a large scale, since a total of around 150 clones were frozen in Indonesia, Malaysia, Ivory Coast and France (Engelmann, 1991a). Embryos could be stored for up to 52 months in liquid nitrogen without any change in recovery rate (Engelmann, 1992). Several hundred palms produced from cryopreserved embryos were planted in the field at La Mé research station (Ivory Coast). No differences were noted in comparison with palms coming from non frozen control embryos as regards their vegetative and floral development (Durand-Gasselino, unpubl. res.). However, routine development of this technique was considerably slowed down by the low and erratic production of finger shaped embryos which were at that time the only structures likely to withstand freezing (Engelmann, 1991a).

Dramatic improvements were made recently to the former process by adding a dehydration step of embryos using silica gel, after their pretreatment on high sucrose medium, before freezing in liquid nitrogen (Dumet et al., 1993). Indeed, this allowed to freeze standard embryos, thus suppressing the limitation imposed by the low production of finger shaped embryos mentioned previously. Moreover, proliferation recovery after thawing was generally higher and more rapid, reaching up to 100% of cryopreserved embryos in some cases.

In this paper, we describe the results obtained when applying this new technique to a large number of clones. Experiments were performed at ORSTOM/Montpellier and IDEFOR-DPO, Ivory Coast.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Clones of somatic embryos used in this study originated from hybrid (Deli x La Mé) adult palms.

Methods

Somatic embryos were produced according to the method of Pannetier et al. (1981). Cultures were maintained on standard medium devoid of growth regulators at 27 ± 1 °C, with a photoperiod of 12 hrs dark/12 hrs light, under a photon flow of $30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Transfers were performed monthly.

For cryopreservation, clumps of embryos weighing 200-300 mg (Fig. 1) were dissected from standard cultures. They were then placed for 7 days (5 clumps/55 mm Petri dish) on medium containing 0.75M sucrose. Clumps of embryos were then transferred onto empty glass Petri dishes (55 mm) placed in air-tight boxes containing silica gel for desiccation. Two types of boxes were used: 150 ml glass boxes, or 500 ml polypropylene boxes. 40 g of silica gel were poured in glass boxes and 80 g in polypropylene ones. Boxes and Petri dishes were autoclaved and silica gel was regenerated for 4-5 hrs in an oven thermostated at 150 °C between two successive experiments. Air-tight boxes containing embryos were placed in the dark at 27 °C for 16 hrs. Dehydrated embryos were then transferred into sterile cryotubes (5 clumps/2 ml cryotube) and frozen by direct immersion of the cryotubes in liquid nitrogen. After a minimum of one

heure dans l'azote liquide, les embryons ont été réchauffés rapidement en plongeant les cryotubes pendant 2 minutes dans un bain-marie thermostaté à 40 °C. Ils ont ensuite été placés pendant une semaine dans des boîtes de Petri contenant 10 ml de milieu de culture additionné de 0,3M de saccharose et 0,2 mg.l⁻¹ de 2,4-D puis transférés sur le même milieu avec une concentration en saccharose réduite (0,1M). Après deux semaines, les embryons ont été placés sur le milieu standard sans régulateurs de croissance puis repiqués tous les mois pour la reprise de leur prolifération et la production de pousses feuillées.

La reprise de prolifération a été observée trois semaines après le réchauffement en comptant le nombre de massifs sur lesquels de nouveaux embryons adventifs étaient apparus. Le nombre de massifs utilisés variait entre 5 et 105, selon les essais. Trois séries d'expérimentations ont été réalisées, deux à l'ORSTOM/Montpellier et une à l'IDEFOR-DPO (Côte-d'Ivoire). Pour la première série d'essais effectuée à Montpellier, les dix clones utilisés avaient été repiqués régulièrement et présentaient donc un aspect morphologique normal (Fig. 1). Le matériel employé en Côte-d'Ivoire était également en bon état. L'essai complémentaire réalisé à Montpellier avait pour but d'évaluer l'effet de l'état physiologique des embryons sur leur potentiel de reprise après la cryoconservation. Dix-neuf clones supplémentaires ont ainsi été cultivés intentionnellement dans des conditions non optimales : les repiquages ont été retardés et effectués à des intervalles irréguliers. Les cultures avaient ainsi un taux de prolifération faible, présentaient de nombreuses structures hyperhydriques, des nécroses et des brunissements dus à la production de composés phénoliques.

RESULTATS

Dans la première série d'essais, la teneur en eau moyenne des massifs était de 24%, variant de 19 à 36% (Tabl. I). Aucune relation entre la survie après dessiccation ou congélation et la teneur en eau n'a été mise en évidence. La survie des massifs après dessiccation variait de manière importante entre les clones, de 13 (clone BC 15) à 80% (clone TRL 70) avec une moyenne de 46%. Après congélation dans l'azote liquide, la survie a été obtenue avec tous les clones, variant de 13 (clones TRL 71 et BC 12) à 100% (clone TRL 21), cependant sur un échantillon réduit (10 massifs) dans ce dernier cas. La survie moyenne était de 32% pendant cet essai.

En Côte-d'Ivoire, les résultats se sont avérés comparables et même légèrement supérieurs à ceux obtenus en France pendant la première série d'essais. La teneur en eau des massifs était équivalente, en moyenne de 22% (Tabl. II). Le pourcentage moyen de survie des massifs témoins déshydratés était de 62%, variant de 10 (clone LMC 248) à 100% (clones LMC 63, 119, 169). 36% des massifs en moyenne ont survécu à la congélation dans l'azote liquide, avec des taux de survie variant entre 10 (clone LMC 63) et 54% (clone LMC 119 et 242). Dans cet essai également, les essais de cryoconservation ont été positifs avec tous les clones.

Dans le second essai réalisé à Montpellier avec des embryons dans un état physiologique non optimal, la survie après congélation dans l'azote liquide s'est avérée beaucoup plus basse (Tabl. III), variant entre 2 (clone TRL 127) et 25% (clone TRL 58), avec une valeur moyenne de 12%. Cependant, la survie a pu être obtenue avec chacun des 19 clones cryoconservés.

Dans tous les essais, même si les massifs d'embryons semblaient sévèrement endommagés par la dessiccation (Fig. 2), la reprise de prolifération a été très rapide et intense avec tous les massifs ayant résisté à la congélation (Fig. 3).

hour storage in liquid nitrogen, embryos were thawed rapidly by immersing the cryotubes for 2 min in a water-bath thermostated at 40 °C. They were then placed for one week in Petri dishes containing 10 ml of recovery medium supplemented with 0.3M sucrose and 0.2 mg.l⁻¹ 2,4-D and then transferred onto the same medium with reduced sucrose content (0.1M). After two weeks, embryos were placed onto standard culture medium devoid of growth regulators and subcultured monthly for proliferation recovery and production of plantlets.

Recovery was recorded three weeks after thawing, by counting the number of clumps on which new adventitious embryos had appeared. The number of clumps used varied between 5 and 105, depending on the experiments. Three sets of experiments were performed, two in ORSTOM/Montpellier and one in IDEFOR-DPO, Ivory Coast. In Montpellier, the first set of experiments used 10 clones which had been subcultured regularly and displayed thus a normal morphological aspect (Fig. 1). Material used in Ivory Coast was also in a good state. The additional experiment performed in Montpellier aimed at evaluating the effect of the physiological state of the embryos on their recovery potential after cryopreservation. Nineteen additional clones were on purpose cultivated in non-optimal conditions: transfers were delayed and performed at irregular intervals. Thus, cultures had a low proliferation rate and appearance of hyperhydric structures as well as numerous necroses and browning due to phenolic compounds were noted.

RESULTS

In the first set of experiments, the average water content of clumps was 24% ranging from 19 to 36% (Table I). There was no relation ship between survival after desiccation or freezing and water content. Survival of clumps after desiccation varied greatly among clones from 13 (clone BC 15) to 80% (clone TRL 70) with an average value of 46%. After freezing in liquid nitrogen, survival was obtained with all clones, ranging from 13% (clones TRL 71 and BC 12) to 100% (clone TRL 21), however in this case with a small number of clumps (10). The average survival rate was 32% during this experiment.

Results in Ivory Coast were comparable and even slightly higher than those obtained in France during the first set of experiments. Water content was comparable with an average of 22% (Table II). Average survival rate of desiccated controls was 62%, ranging from 10 (clone LMC 248) to 100% (clones LMC 63, 119, 169). An average of 36% clumps survived after freezing in liquid nitrogen with values ranging between 10 (clone LMC 63) and 54% (clone LMC 119 and 242). Here also cryopreservation attempts were successful with all clones.

In the second set of experiments performed in Montpellier using material in non-optimal physiological state, survival after freezing in liquid nitrogen was much lower (Table III), ranging from 2 (clone TRL 127) to 25% only (clone TRL 58), with an average value of 12%. However, survival could be obtained with all 19 clones cryopreserved.

In all experiments, even though clumps of embryos seemed to be severely damaged by the desiccation treatment (Fig. 2), proliferation recovery was very rapid and intense with all clumps surviving after cryopreservation (Fig. 3).

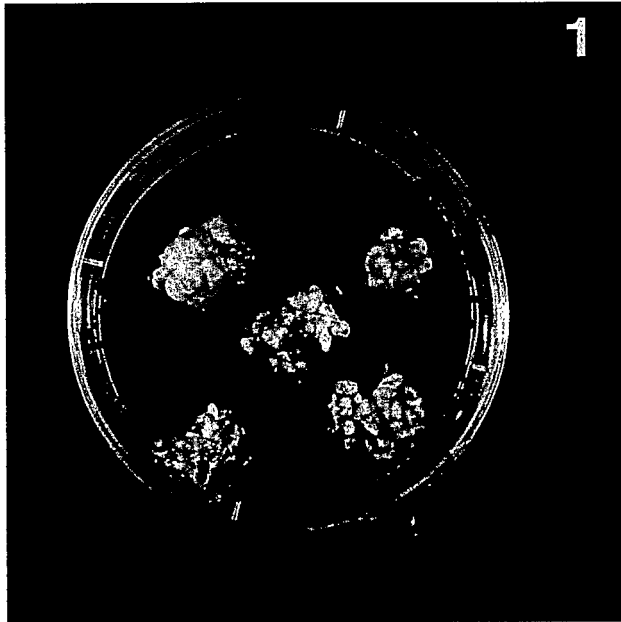


FIG. 1. — Massifs d'embryons standards utilisés pour la cryoconservation. (Barre : 1 cm) — (Clumps of standard somatic embryos used for cryopreservation. —scale bar: 1 cm)



FIG. 2. — Massifs d'embryons standard après dessiccation au silicagel. (Barre : 1 cm) — (Clumps of standard somatic embryos after desiccation treatment with silicagel —scale bar: 1cm)

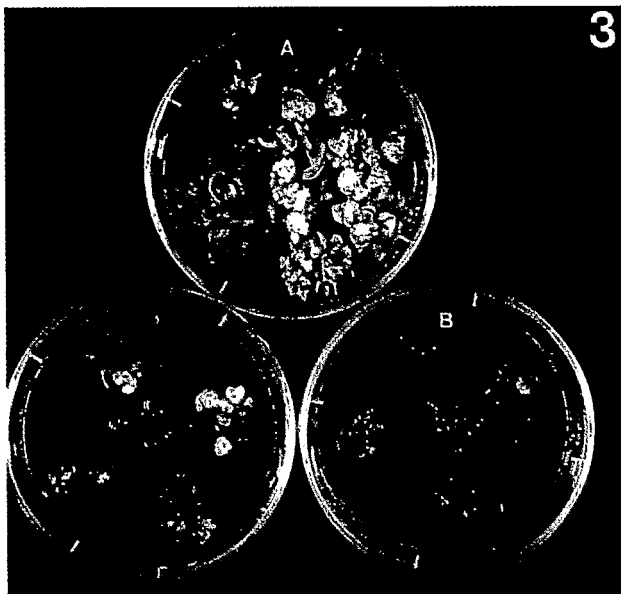


FIG. 3. — Reprise de la prolifération d'embryons somatiques standard, 3 semaines après la congélation et le réchauffement. (Barre : 1 cm). A : clone en état physiologique optimal ; B : clone en état physiologique non optimal. — (Proliferation recovery of standard somatic embryos, 3 weeks after freezing and thawing —scale bar: 1 cm— A: clone in optimal physiological state; B: clone in non optimal physiological state)

TABLEAU I. — Teneur en eau (% du poids frais initial) et survie (donnée en % entre parenthèses) d'embryons somatiques de palmier à huile déshydratés (-LN) et cryoconservés (+LN). Première série d'essais réalisés à l'ORSTOM/Montpellier. - : non mesuré — (Water content —% of initial fresh weight— and survival —indicated in % between brackets— of desiccated control (-LN) and cryopreserved (+LN) oil palm somatic embryos. First set of experiments performed at ORSTOM/Montpellier. - : not measured)

Clone N°	Teneur en eau (Water content) %	Survie (Survival)	
		-LN	+LN
LMC 63	30	6/10 (60)	10/10 (100)
LMC 74	23	15/30 (50)	5/30 (17)
TRL 59	—	—	7/10 (70)
TRL 70	34	8/10 (80)	5/10 (50)
BC 15	36	4/30 (13)	54/30 (16)
TRL 71	32	20/30 (67)	4/30 (13)
BC 08	19	21/30 (70)	16/30 (53)
LMC 204	35	15/30 (50)	13/30 (46)
BC 11	20	6/30 (20)	11/30 (37)
BC 12	28	12/30 (40)	4/30 (13)

TABLEAU II. — Teneur en eau (% du poids frais initial) et survie (donnée en % entre parenthèses) d'embryons somatiques de palmier à huile déshydratés (-LN) et cryoconservés (+LN). Essais réalisés à l'IDEFOR/DPO, Côte-d'Ivoire. — (*Water content - % of initial fresh weight - and survival - indicated in % between brackets - of desiccated control (-LN) and cryopreserved (+LN) oil palm somatic embryos. Experiments performed at IDEFOR/DPO, Ivory Coast*)

Clone N°	Teneur en eau (<i>Water content</i>) %	Survie (<i>Survival</i>)	
		-LN	+LN
LMC 22	26	6/25 (24)	7/50 (14)
LMC 44	23	14/30 (47)	16/54 (30)
LMC 51	22	17/40 (43)	20/85 (24)
LMC 63	29	40/40 (100)	11/105 (10)
LMC 119	23	25/25 (100)	49/90 (54)
LMC 169	21	20/20 (100)	29/75 (39)
LMC 242	19	11/20 (55)	27/50 (54)
LMC 246	22	4/5 (80)	8/50 (16)
LMC 248	29	1/10 (10)	15/40 (38)
LMC 249	26	10/25 (40)	20/50 (40)

TABLEAU III. — Survie (indiquée en % entre parenthèses) d'embryons somatiques de palmier à huile cryoconservés. Deuxième série d'essais réalisés à l'ORSTOM/Montpellier — (*Survival - indicated in % between brackets - of cryopreserved oil palm somatic embryos. Second set of experiments performed at ORSTOM/Montpellier*)

Clone N°	TRL 13	TRL 14	TRL 17	TRL 22	TRL 25	TRL 26	TRL 28	TRL 47	TRL 55	TRL 57
Survie (<i>Survival</i>) (%)	14/79 (18)	3/47 (6)	5/43 (12)	6/50 (12)	1/34 (3)	3/36 (8)	1/35 (3)	4/32 (13)	7/35 (20)	5/49 (10)
Clone N°	TRL 58	TRL 83	TRL 84	TRL 85	TRL 93	TRL 99	TRL 119	TRL 121	TRL 127	
Survie (<i>Survival</i>) (%)	11/44 (25)	7/50 (14)	5/45 (11)	10/50 (20)	3/45 (7)	5/50 (10)	5/50 (10)	7/50 (14)	1/48 (2)	

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le nouveau protocole de cryoconservation mis au point avec des embryons standards, qui comprenait une étape de déshydratation, s'est révélé très efficace puisque la reprise de prolifération après congélation a pu être obtenue pour l'ensemble des 39 clones traités dans deux laboratoires différents. L'état physiologique des cultures s'est avéré extrêmement important puisque, si la survie des embryons en bon état variait entre 32% (Montpellier) et 36% (Côte-d'Ivoire), elle chutait à 12% seulement avec des cultures dans un état non optimal. Cependant, il faut souligner que la survie a été obtenue même dans ce cas. Les différences importantes observées entre les clones après la cryoconservation (2 à 100% de survie) sont liées à l'aspect morphologique et donc à l'état physiologique des cultures. De plus, la durée de déshydratation utilisée (16 heures) n'était peut être pas optimale pour tous les clones.

Ce procédé de cryoconservation est original puisqu'il combine un prétraitement avec une concentration en sucre élevée qui est classiquement utilisé pour différents matériels tels que des suspensions cellulaires, des cals ou des apex et une dessiccation qui est généralement employée pour les embryons zygotiques (Engelmann, 1991b). Une telle combinaison n'a, jusqu'à présent, été utilisée qu'avec les embryons zygotiques de cocotier (Assy-Bah et Engelmann, 1992).

Cette étude a permis de souligner l'importance du saccharose et de la dessiccation pour obtenir la survie après la congélation dans l'azote liquide. Le saccharose pénètre dans les cellules des embryons somatiques en quantité importante (Dumet, résultats non publiés) et stabilise les structures cellulaires lors d'une déshydratation poussée (Crowe *et al.*, 1988). Des analyses thermiques réalisées pendant la congélation d'embryons somatiques de palmier à huile déshydratés ont révélé que toute l'eau libre avait été extraite des cellules (Dumet *et al.*, en préparation). En conséquence, les solutés intracellulaires vitrifient (c'est-à-dire qu'ils se soli-

DISCUSSION CONCLUSION

The new cryopreservation protocol set up with standard embryos, which included a dehydration step, was very efficient since recovery after freezing in liquid nitrogen could be obtained with all of the 39 clones experimented in two different laboratories. The morphological appearance of the cultures was of paramount importance since, if survival of embryos in a good state varied between 32 (Montpellier) and 36% (Ivory Coast), it dropped to 12% only when cultures in non-optimal physiological state were used. However, we have to underline that recovery was obtained even in the former cases. The great differences observed between clones after cryopreservation (from 2 to 100% survival) were linked with the morphological and thus physiological state of the cultures. Also, the dehydration period used (16 hrs) may not be optimal for all clones.

This cryopreservation protocol is original since it combines a pregrowth treatment with high sugar concentration which is classically used for many types of materials, cell suspensions, calluses or apices and a desiccation treatment which is generally employed with zygotic embryos (Engelmann, 1991b). Such a combination was used until now with zygotic embryos of coconut only (Assy-Bah and Engelmann, 1992).

This work allowed to underline the importance of sucrose and desiccation for survival after freezing in liquid nitrogen. Sucrose enters cells of oil palm somatic embryos in large quantities (Dumet, unpubl. res.) and stabilizes cell structures during extensive dehydration (Crowe *et al.*, 1988). Thermal analyses performed during freezing after dehydration of oil palm somatic embryos revealed that all freezable water had been extracted from cells (Dumet *et al.*, in preparation). In consequence, intracellular solutes vitrified (i.e.

difiant en une structure vitreuse amorphe), ce qui évite ainsi les effets destructeurs de la cristallisation sur les structures cellulaires.

En conclusion, l'application en routine de la cryoconservation est maintenant possible pour les embryons somatiques de palmier à huile avec ce procédé amélioré. Il est préférable d'utiliser les cultures quand elles sont dans un état morphologique et physiologique optimal. Cependant, cette technique peut être employée même avec des cultures dans un état non optimal. Ce procédé est en cours d'application pour tous les clones multipliés à l'ORSTOM/Montpellier et à l'IDEFOR (Côte-d'Ivoire). Le palmier à huile représente donc toujours le premier exemple d'application en routine de la cryoconservation à une espèce végétale multipliée *in vitro*.

Remerciements. — Les auteurs remercient V. Leruste pour son aide précieuse lors de la deuxième série d'essais réalisés à l'ORSTOM/Montpellier. Ce travail a été effectué dans le cadre d'un programme de recherche commun entre l'ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération), le CIRAD-CP (Centre international de recherche agronomique pour le développement-Département cultures pérennes) et de l'IDEFOR-DPO (Institut des forêts-Département plantes oléagineuses - Côte-d'Ivoire).

solidified into an amorphous glassy state), thus avoiding detrimental effects of intracellular crystallization to cell structures.

In conclusion, routine application of cryopreservation to oil palm somatic embryos is now easily feasible using this improved process. Cultures should be used when they are in an optimal morphological and physiological state in order to ensure higher survival rates. However, this technique is applicable even to cultures in a non optimal condition. This process is being applied presently to all clones multiplied in ORSTOM/Montpellier and IDEFOR (Ivory Coast). Therefore oil palm still represents the first example of routine application of cryopreservation to plants cultivated in vitro.

Acknowledgements. — The authors wish to thank V. Leruste for her valuable help in the second set of cryopreservation experiments carried out at ORSTOM/Montpellier. This work was performed in the frame of a joined research programme between ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération), CIRAD-CP (Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement-Département Cultures Pérennes) and IDEFOR-DPO (Institut des forêts - Département plantes oléagineuses - Ivory Coast).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASSY-BAH B. et ENGELMANN F. (1992). — Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo-Letters*, 13, 117-126.
- [2] CROWE J.H., CROWE L.M., CARPENTER J.F., RUDOLPH A.S., WISTROM C.A., SPARGO B.J. et ANCHORDOGUY T.J. (1988). — Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 947, 367-384.
- [3] DUMET D., ENGELMANN F., CHABRILLANGE N. et DUVAL Y. (1993). — Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports*, 12, 352-355.
- [4] ENGELMANN F. (1991a). — Le développement actuel de la cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile. In : Proc. XVIIIe Cong., Int. Froid (IIF ed.), Montréal, 10-17 août, vol. IV, pp. 1676-1680.
- [5] ENGELMANN F. (1991b). — *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. *Euphytica*, 57, 227-243.
- [6] ENGELMANN F. (1992). — Cryopreservation of embryos. In : Reproductive Biology and Plant Breeding (Y. DATTEE, C. DUMAS and A. GALLAIS, eds), Springer Verlag, Berlin, pp. 281-290.
- [7] ENGELMANN F. et DEREUDDRE J. (1988). — Cryopreservation of oil palm somatic embryos : importance of the freezing process. *Cryo-Letters*, 9, 220-235.
- [8] 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, 111-116.
- [9] PANNETIER C., ARTHUIS P. et LIEVOUX D. (1981). — Néoformation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oléagineux*, 36, (3) : 119-122.

RESUMEN

Desarrollo de la crioconservación de los embriones somáticos de palma aceitera mediante un procedimiento mejorado.

D. DUMET, F. ENGELMANN, N. CHABRILLANGE, F. RICHAUD, T. BEULE, T. DURAND-GASSELIN, Y. DUVAL, *Oléagineux*, 1993, 48, N°6, p. 273-278

Se ha desarrollado un nuevo procedimiento de crioconservación que incluye una etapa de desecación con silicagel antes de congelar en nitrógeno líquido para los embriones somáticos estandarizados de palma aceitera. Se aplicó exitosamente en Francia y en Costa de Marfil a 39 clones diferentes. La supervivencia después de crioconservación fue conseguida con todos los clones, con tasas que variaban entre 2 y 100%. Los clones que tenían un aspecto morfológico normal presentaron una tasa de supervivencia significativamente mayor (34% como promedio) a la de los que estaban en mal estado fisiológico (12% como promedio). Ahora, se aplicó de rutina la crioconservación a los embriones somáticos de palma aceitera con este procedimiento mejorado.

Palabras claves. — Palma aceitera, embriones somáticos, crioconservación, desecación, silicagel