

La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique

J. AHÉE (4), P. ARTHUIS (3), G. CAS (4), Y. DUVAL (3), G. GUÉNIN (4), J. HANOWER (2), P. HANOWER (2), D. LIEVOUX (4), C. LIORET (1), B. MALAURIE (2), C. PANNETIER (3), D. RAILLOT (4), C. VARECHON (2) et L. ZUCKERMAN (4)

Résumé. — Le procédé de multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile, proposé par Rabéchault et Martin [1976] a été amélioré. Soixante et un clones sous forme de cals primaires ont été obtenus à partir de jeunes feuilles d'arbres adultes ou de plants de pépinière. Les cals primaires évoluent, après une période qui a été considérablement abrégée, en cultures à croissance rapide (CCR). Les CCR, dans des conditions appropriées, différencient des embryoides somatiques. Le traitement des embryoides permet leur développement en plantules viables. Les palmiers issus des premiers embryoides obtenus en 1976 ont fleuri en juillet 1980.

INTRODUCTION

La réalisation de la reproduction végétative du palmier à huile, plante pérenne et allogame à reproduction strictement sexuée, présente, compte tenu de son grand intérêt économique, un avantage évident en vue de la multiplication des individus à caractères exceptionnels.

Le phénomène ne se produisant pas naturellement, des travaux utilisant les possibilités offertes par les méthodes de culture de tissus *in vitro* ont été entrepris. Cette voie permet théoriquement d'obtenir un nombre illimité de plantes à partir d'un fragment de tissu. Le matériel obtenu présente le maximum de garanties sanitaires. Les tissus, conservés sous un faible volume, permettent la constitution de « banques » de matériel génétique beaucoup plus commodes, pour l'utilisation et la conservation, que les collections d'individus adultes en champs. La valorisation des résultats de la sélection est réalisée avec un gain de temps considérable et le matériel végétal fourni aux plantations est beaucoup plus intéressant, tant sur le plan de la production que sur celui de l'homogénéité.

Des résultats encourageants ont été obtenus. Parmi les travaux réalisés à l'étranger, on peut citer ceux de Staritsky [1970], Jones [1974], Corley [1977], Corley *et al.* [1977, 1979].

En France, des études menées au Laboratoire de Physiologie Végétale des Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM à Bondy, dans le cadre d'une convention ORSTOM-I.R.H.O., ont abouti à la mise au point d'un procédé de production de jeunes plantes à partir des tissus foliaires [Rabéchault et Martin, 1976].

Une équipe mixte, composée de chercheurs appartenant aux deux organismes, a axé ses travaux sur l'amélioration du procédé de Rabéchault et Martin du point de vue de la fiabilité, du rendement, du raccourcissement de la durée des différentes étapes. L'application a porté sur un nombre important d'arbres sélectionnés. La présente publication fait le point sur les résultats acquis.

(1) Professeur à l'Université de Paris XI, responsable de l'équipe de chercheurs ORSTOM-I.R.H.O. (*).

(2) Chercheur ORSTOM (*).

(3) Chercheur I.R.H.O. (*).

(4) Technicien ORSTOM (*).

(*) Adresse : Laboratoire de Physiologie végétale, Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM, 72-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

I. — OBTENTION DE CALS PRIMAIRES A PARTIR DE FRAGMENTS FOLIAIRES

Le matériel végétal est constitué de fragments de jeunes feuilles prélevées sans léser l'apex, de telle sorte que la repousse de l'arbre est toujours possible. Le nombre d'explants peut être d'environ 400 à partir d'un plant de 2 ans (âge compté à partir de la germination), et de plus de 1 000 à partir d'un arbre adulte.

Les premiers cals apparaissent environ 60 jours après la mise en culture ; à 100 jours, le nombre d'explants porteurs de cals n'évolue pratiquement plus. Ceux-ci sont alors isolés et repiqués sur de nouveaux milieux de culture.

Le pourcentage de réussite par arbre varie selon l'individu d'origine, le niveau sur la feuille et, de façon très significative, avec la concentration en phytohormones.

Des travaux récents ont permis d'améliorer très sensiblement les rendements ainsi que l'état des cals produits. Ils ont porté sur les techniques de préparation du matériel, de mise en culture, d'isolement des cals et également sur les milieux de culture et les conditions d'environnement.

Il a été possible d'obtenir des cals primaires aussi bien à partir d'arbres adultes que de plants de pépinière. Le pourcentage d'explants issus d'un arbre et porteurs de cals à 100 jours est rarement inférieur à 20 p. 100. Dans un certain nombre de cas ces pourcentages sont supérieurs à 60 p. 100.

Les cals apparaissent au niveau des nervures, ils sont formés de cellules de petite taille étroitement accolées (Fig. 1). Ils poursuivent leur croissance sur l'explantat d'origine (Fig. 2). Après leur isolement, cette croissance, quoique lente (un accroissement de 50 p. 100 de la matière fraîche peut être observé en 2 mois), se poursuit au cours des subcultures successives. Les cals sont de couleur beige. En subculture ils acquièrent une structure dite « nodulaire » ; ils sont en effet formés de petits nodules liés les uns aux autres, de taille variable, les plus gros ayant un diamètre n'excédant pas 0,5 cm (Fig. 3). Dans certains cas cet aspect nodulaire est masqué, probablement par la présence de tissus desquandants donnant un cal plus diffus.

Hormis de nombreux cals obtenus par la technique lors des premiers travaux sur du matériel d'origine mal connue, on a créé au laboratoire 61 lots de cals provenant de 61 arbres différents ; 53 arbres proviennent de 6 croisements *E. guineen-*

ORSTOM
Fonds Documentaire

N° : 82/84/01379 M

Cote : B. ex 1

Date : 18 MAI 1982

sis × *E. guineensis* et 8 arbres proviennent de 5 hybrides interspécifiques *E. guineensis* × *E. melanococca*.

L'ensemble de ces cals a été maintenu sur milieu artificiel afin d'obtenir la formation de cultures de tissu à croissance rapide.

II. — PRODUCTION DES CULTURES DE TISSU A CROISSANCE RAPIDE

Une des étapes conduisant à la régénération de jeunes plantes de palmier à huile par la méthode de multiplication végétative *in vitro* est l'obtention de cultures de tissu à croissance rapide.

Placés sur des milieux appropriés certains des cals évoluent (Fig. 4) en une forme que nous avons appelée cultures de tissu à croissance rapide (CCR), par opposition aux cals primaires. Pour la majorité d'entre elles, le temps de doublement de la matière fraîche varie entre 10 et 20 jours suivant la culture considérée et le milieu utilisé. Toutefois pour un certain nombre d'entre elles, ce temps est beaucoup plus long et peut atteindre 30 ou même 60 jours.

L'aspect et la structure des cultures à croissance rapide sont très différents de ceux des cals primaires. Elles se caractérisent par une teinte plus claire, une structure légère et aérée quelque peu granuleuse (Fig. 5) et une grande friabilité au toucher. En coupe, la structure des CCR comporte des massifs dispersés de cellules méristématiques, des cellules de grandes dimensions et des espaces lacunaires (Fig. 6).

Les premières cultures de tissu obtenues au laboratoire demandaient 2 à 3 ans pour s'établir; depuis, des améliorations apportées au niveau du traitement des explants foliaires et des techniques culturales en général, ainsi que des modifications de la composition des milieux de culture ont permis de réduire notablement ce délai. Il se situe pour la plupart d'entre elles, obtenues dans les conditions évoquées ci-dessus, entre 6 et 12 mois après la mise en culture des explants. Par ailleurs, ce phénomène, de rare est devenu fréquent.

Au cours des années 1979-1980, on a obtenu 80 souches de CCR, issues de 22 arbres. Ainsi, pour 61 arbres mis en culture depuis 1978 et ayant donné des cals primaires, 22 ont donné, à ce jour, des cultures de tissu à croissance rapide. Beaucoup de cals sont d'obtention trop récente pour avoir manifesté la transformation en CCR. Cette collection de tissu à croissance rapide constitue le matériel de départ pour la régénération des jeunes plantes.

III. — EMBRYOGENÈSE

Pour un clone donné, lorsque la quantité de tissu à croissance rapide est suffisante, on procède à la phase suivante :

Les tissus sont placés dans de nouvelles conditions de culture; au bout d'un temps variable, on observe l'apparition de formations blanches aux contours bien délimités (Fig. 7); elles se polarisent et deviennent chlorophylliennes (Fig. 8). Ces formations sont indépendantes des tissus adjacents. Elles sont structurellement très proches de véritables embryons d'*Elaeis* [Vallade, 1965]. En effet, elles possèdent une limbe cotylédonaire vascularisé bien individualisé et ont différencié ce qui peut être assimilé à un pôle caulinaire et un pôle radicaire (Fig. 9A et B). Ces formations semblent correspondre à des embryoides et le

phénomène a toutes les caractéristiques d'une embryogenèse somatique [Reinert, 1973].

De tels embryoides ont été obtenus, aussi bien à partir d'*E. guineensis* que d'arbres appartenant à des hybrides interspécifiques *E. guineensis* × *E. melanococca*.

IV. — OBTENTION DE JEUNES PLANTES

Lorsque les embryoides formés sur les tissus à croissance rapide ont atteint une certaine dimension, ils sont isolés et repiqués sur un milieu stimulant leur développement. La figure 10 montre différents stades de développement.

A la suite de ce repiquage, dans un certain nombre de cas, on observe un phénomène de multiplication qui permet d'obtenir, à partir d'un seul embryotide visible isolé, plusieurs jeunes plantes feuillées (Fig. 11).

Après un délai de l'ordre de 2 mois, l'appareil aérien atteint environ 2 cm. Certains individus possèdent feuilles et racines, et constituent à ce stade des plants complets; d'autres en nombre important, doivent subir un traitement complémentaire d'enracinement. A la suite de ce traitement, toutes les plantes présentent, dans un délai de 3 semaines, de grosses racines adventives (Fig. 12). La culture des plantules *in vitro* est poursuivie afin qu'elles atteignent une dimension suffisante (longueur de feuille d'environ 10 cm) pour être transférées en conditions non axéniques (Fig. 13). Tant par la quantité de tissus pouvant être obtenue du fait de la prolifération des CCR que par la faculté d'automultiplication des embryoides, la production en masse de plantules est tout à fait possible (Fig. 14). Grâce à la mise au point du traitement provoquant une rhizogenèse active, les jeunes plantes produites actuellement peuvent poursuivre un développement satisfaisant après leur retour aux conditions habituelles de culture.

De nombreuses plantules issues de culture *in vitro* ont été envoyées dans différents pays, en particulier sur la Station de La Mé en Côte-d'Ivoire. Elles sont tout d'abord placées en préépinière puis en épinière (Fig. 15) avant d'être plantées en champ.

Les premières d'entre elles, issues d'embryoides obtenus en 1976, ont été plantées à La Mé en juin 1978. Les caractéristiques de croissance et l'aspect morphologique des arbres paraissent tout à fait normaux 2 ans après (Fig. 16); leur caryotype est tout à fait conforme ($2n = 32$) et les premières inflorescences sont apparues en juillet 1980.

CONCLUSION

L'embryogenèse somatique du palmier à huile paraît maîtrisée et permet d'obtenir des clones d'individus issus de pieds-mères définis.

Les travaux se poursuivent à Bondy, en vue de confirmer la répétitivité du phénomène, d'en diminuer le coût et de réduire les délais de réalisation. Il est connu que les conditions de culture *in vitro*, permettant l'obtention d'embryons somatiques, peuvent provoquer des modifications du génôme ou de son fonctionnement, avec productions d'individus non conformes au matériel de départ. Si, jusqu'à présent, les premiers résultats sont très satisfaisants, le risque demeure. Il sera d'autant plus faible que les maintiens sur milieux artificiels seront plus courts. Les résultats de Pannetier *et al.* [1981] montrent que des progrès encourageants ont été obtenus dans cette voie.

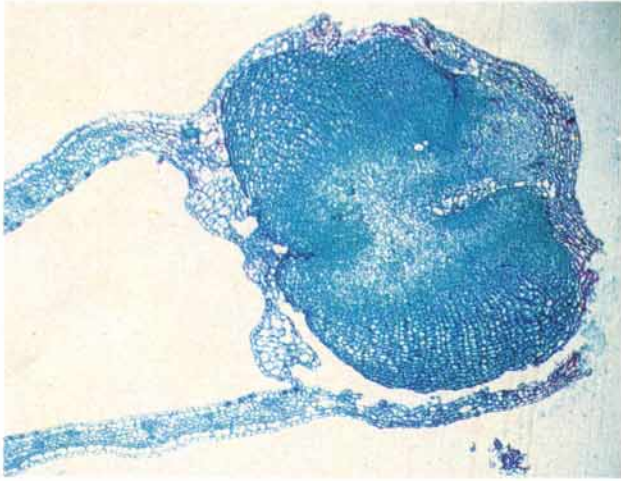


FIG. 1

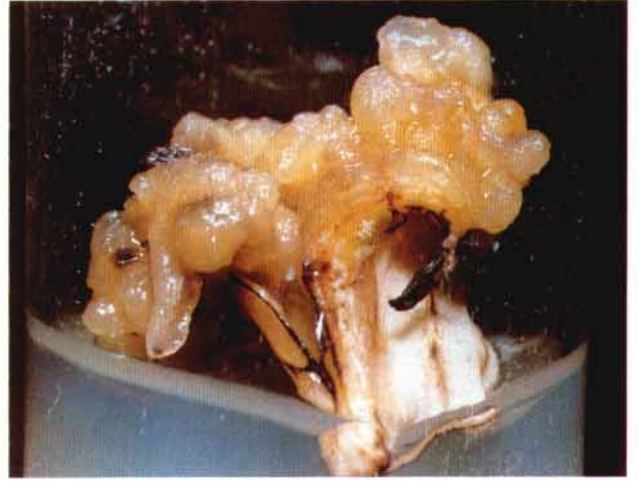


FIG. 2



FIG. 3



FIG. 4



FIG. 5

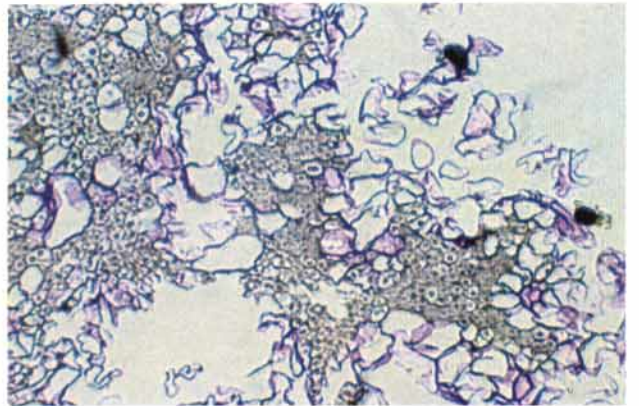


FIG. 6



FIG. 7



FIG. 8

Légendes des figures

- FIG. 1. — Coupe transversale d'un cal primaire, qui s'est développé au niveau d'une nervure d'une jeune feuille (coloration P.A.S. Fast Green).
FIG. 2. — Cal primaire développé sur un explant foliaire âgé de 90 jours. On distingue bien l'aspect nodulaire.
(Pour toutes les macrophotographies, le diamètre du tube est de 24 mm).
FIG. 3. — Cal primaire en subculture.
FIG. 4. — Apparition d'une CCR sur la partie gauche du cal.
FIG. 5. — Culture à croissance rapide en entretien.
FIG. 6. — Coupe histologique d'une CCR (coloration P.A.S. hématoxyline).
FIG. 7. — Apparition d'embryoïdes sur une CCR.
FIG. 8. — La culture de la figure 7 observée 15 jours plus tard.
FIG. 9A. — Coupe longitudinale d'un embryoïde (cf. 9B). (coloration hématoxyline).
FIG. 9B. — En 1 : limbe cotylédonaire (évoluant normalement en haustorium chez les embryons issus de reproduction sexuée).
En 2 et 2' : formations caulinaires.
En 3 : pôle racinaire. Il semble que plusieurs pôles caulinaires se différencient pour un même cotylédon.
FIG. 10. — Divers stades de développement des embryoïdes (le trait blanc représente 1 cm).
FIG. 11. — Développement des parties aériennes à partir de plusieurs embryoïdes accolées.
FIG. 12. — Développement d'un système racinaire après traitement rhizogène.
FIG. 13. — Jeune plante, prête au transfert en conditions non axéniques.
FIG. 14. — Plantules appartenant à un même clone.
FIG. 15. — Jeunes pieds appartenant à différents clones et d'âges différents en pépinière.
FIG. 16. — Aspect en septembre 1980 de pieds plantés en juin 1978.

Captions for figures

- FIG. 1. — *Cross-section of a primary callus, developed at level of vein of young leaf (PAS Fast Green Staining).*
FIG. 2. — *Primary callus developed on a leaf explant 90 days old. The nodular appearance is clearly visible (for all macrophotographies, the tube diameter is 24 mm).*
FIG. 3. — *Primary callus in subculture.*
FIG. 4. — *Appearance of a FGC on left of callus.*
FIG. 5. — *FGC on maintenance.*
FIG. 6. — *Histological section of a FGC (PAS staining : hematoxylin).*
FIG. 7. — *Appearance of embryoïds on a FGC.*
FIG. 8. — *Culture in figure 7 observed 15 days later.*
FIG. 9A. — *Longitudinal section of an embryoïd (cf. 9B). (Hematoxylin staining).*
FIG. 9B. — *In 1 : cotyledonary lamina (evolving normally into haustorium in embryos derived from sexual reproduction).
In 2 and 2' : cauline formations.
In 3 : radicular pole. Several cauline poles seem to differentiate for a single cotyledon.*
FIG. 10. — *Various stages of embryoïd development (the white line = 1 cm).*
FIG. 11. — *Development of aerial parts from several linked embryoïds.*
FIG. 12. — *Development of a root system after rhizogenic treatment.*
FIG. 13. — *Young plant ready for transfer to non-axenic conditions.*
FIG. 14. — *Plantlets belonging to a single clone.*
FIG. 15. — *Young stocks from different clones and of different ages in the nursery.*
FIG. 16. — *Appearance of stocks planted in June 1978, in September 1980.*

Texto de figuras

- FIG. 1. — Corte transversal de un callo primario que se ha desarrollado a nivel de una nervadura de una hoja joven (coloración P.A.S. Fast Green).
FIG. 2. — Callo primario desarrollado en un explante de hoja de 90 días de edad. Se distingue muy bien el aspecto nodular
(para todas las macrofotografías el diámetro del tubo es de 24 mm).
FIG. 3. — Callo primario en subcultivo.
FIG. 4. — Aparición de un CCR en la parte izquierda del callo.
FIG. 5. — Cultivo de crecimiento rápido en mantenimiento.
FIG. 6. — Corte histológico de un CCR (coloración P.A.S. hematoxilina).
FIG. 7. — Aparición de embrioides en un CCR.
FIG. 8. — Después de 15 días se observa el cultivo de la figura 7.
FIG. 9A. — Corte longitudinal de un embrioides (cf. 9B) (coloración hematoxilina).
FIG. 9B. — 1 : limbo cotiledóneo (que normalmente evoluciona en haustorium en los embriones procedentes de la reproducción sexual).
2 y 2' : formaciones caulinares.
3 : polo radical. Parece que para un mismo cotiledón se diferencian varios polos caulinares.
FIG. 10. — Varias etapas de desarrollo de embrioides (el trazo blanco representa 1 cm).
FIG. 11. — Desarrollo de las partes aéreas a partir de varios embrioides unidos.
FIG. 12. — Desarrollo de un sistema radical después del tratamiento rizogéno.
FIG. 13. — Planta joven lista para el traslado en condiciones no axénicas.
FIG. 14. — Plántulas que pertenecen a un mismo clon.
FIG. 15. — Pies jóvenes que pertenecen a diversos clones y de edades distintas en el semillero.
FIG. 16. — Aspecto en septiembre 1980 de pies sembrados en junio 1978.

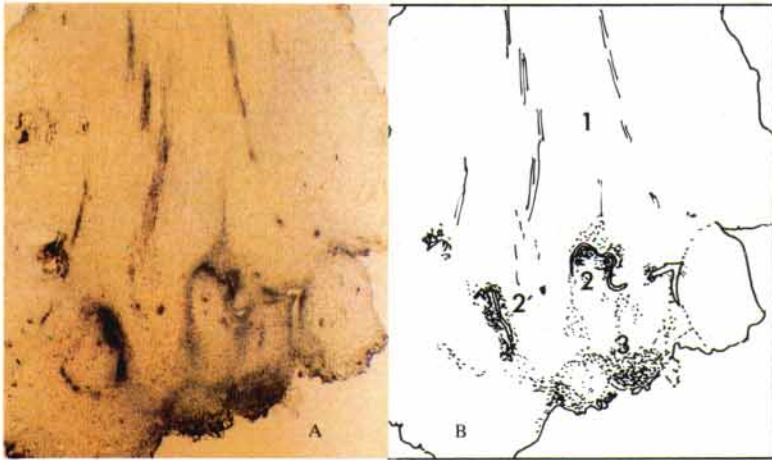


FIG. 9



FIG. 10



FIG. 11 ▲



FIG. 12 ▲



FIG. 13 ►

◀ FIG. 14



FIG. 15

◀ 16 ►



Remerciements. — Nous remercions la Station de La Mé (Côte-d'Ivoire) pour la fourniture du matériel végétal. Nous remercions également MM. J. Schwendiman et P. Pallares, du Laboratoire de Cytogénétique du GERDAT, qui nous ont aidé pour la préparation des coupes histologiques et M. J. Lortic, du service de Télédétection de l'ORSTOM, qui nous a conseillé pour la réalisation des photographies.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CORLEY R. H. V. (1977). — First clonal oil palms planted in the field. *Planter*, 53, N° 616, p. 331-332.
- [2] CORLEY R. H. V., BARRETT J. N., JONES L. H. (1977). — Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. *Oil Palm News*, N° 22, p. 2-7.
- [3] CORLEY R. H. V., WOOIK C. et WONG C. Y. (1979). — Progress with vegetative propagation of oil palm. *Planter*, 55, N° 641, p. 377-380.
- [4] JONES L. H. (1974). — Propagation of clonal oil palms by tissue culture. *Oil Palm News*, N° 17, p. 1-8; *Planter*, 1974, 50, N° 585, p. 374-381.
- [5] PANNETIER C., ARTHUIS P. et LIEVOUX D. (1981). — Néo-formation 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.
- [6] RABECHAULT H. et MARTIN J. P. (1976). — Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 283, Sér. D., p. 1735-1737.
- [7] REINERT J. (1973). — In : *Plant tissue and cell culture*, ed. H. E. STREET (Blackwell sci. Publ.), G.B., p. 338-357.
- [8] STARITSKY G. (1970). — Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), as a tool for its vegetative propagation. *Euphytica*, 19, p. 288-292.

SUMMARY

Vegetative propagation of the oil palm *in vitro* by somatic embryogenesis.

J. AHÉE, P. ARTHUIS, G. CAS, Y. DUVAL, G. GUÉNIN, J. HANOWER, P. HANOWER, D. LIEVOUX, C. LIORET, B. MALAURIE, C. PANNETIER, D. RAILLOT, C. VARECHON and L. ZUCKERMAN, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 3, p. 113-118.

The method of vegetative propagation of the oil palm *in vitro* proposed by Rabéchault and Martin [1976] has been improved. Sixty-one clones in the form of primary calluses have been obtained from young leaves of adult trees or nursery plants. The primary calluses evolve, after a period which has been considerably shortened, into fast-growing cultures (FGC). The FGC, under appropriate conditions, differentiate somatic embryoïds. Treatment of the embryoïds enables them to develop into viable plantlets. The palms from the first embryoïds obtained in 1976 flowered in July 1980.

RESUMEN

La propagación vegetativa *in vitro* de la palma africana por embriogénesis somática.

J. AHÉE, P. ARTHUIS, G. CAS, Y. DUVAL, G. GUÉNIN, J. HANOWER, P. HANOWER, D. LIEVOUX, C. LIORET, B. MALAURIE, C. PANNETIER, D. RAILLOT, C. VARECHON y L. ZUCKERMAN, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 3, p. 113-118.

Se ha mejorado el procedimiento de propagación vegetativa *in vitro* de la palma aceitera, propuesto por Rabéchault y Martin [1976]. Se obtuvo sesenta y un clones bajo la forma de callos primarios a partir de hojas jóvenes de árboles adultos o de plantones de semillero. Los callos primarios evolucionan, después de un período que ha sido notablemente acortado, en cultivos de crecimiento rápido (CCR). En condiciones adecuadas los CCR producen por diferenciación embrioides somáticos. El tratamiento de embrioides permite que se desarrollen en plántulas viables. Las palmas resultantes de los primeros embrioides logrados en 1976 florecieron en julio de 1980.

Vegetative propagation of the oil palm *in vitro* by somatic embryogenesis

J. AHEE (4), P. ARTHUIS (2), G. CAS (4), Y. DUVAL (3), G. GUENIN (4), J. HANOWER (2), P. HANOWER (2), D. LIEVOUX (4), C. LIORET (1), B. MALAURIE (2), C. PANNETIER (3), D. RAILLOT (4), C. VARECHON (2) and L. ZUCKERMAN (4)

INTRODUCTION

Given its great economic value, vegetative propagation of the oil palm, a perennial allogamous plant with strictly sexual reproduction, has obvious advantages from the point of view of the multiplication of individuals with exceptional characters.

The phenomenon does not occur naturally, so work using the possibilities of *in vitro* tissue culture was undertaken. Theoretically, this enables an unlimited number of plants to be reproduced from a tissue

fragment. The material obtained presents the maximum sanitary guarantees. The tissues, which take up little room, allow « banks » of genetic material to be constituted, which are much more convenient for use and conservation than collections of adult individuals in the field.

The results of plant breeding are valorized in considerably less time, and planting material supplied to the plantations is much more worthwhile from the standpoint of both yield and homogeneity.

Encouraging results were obtained. Among the work carried out abroad, the following should be cited : Staritsky, [1970] ; Jones, [1974] ; Corley, [1977] ; Corley et al. [1977, 1979].

In France, studies carried out at the Plant Physiology Laboratory at Bondy of the ORSTOM's Central Scientific Departments in the framework of the ORSTOM-I.R.H.O. agreement, led to the development of a method for producing young plantlets from leaf tissues [Rabéchault and Martin, 1976].

(1) Professor at the University of Paris XI, head of the ORSTOM-I.R.H.O. research team (*).

(2) ORSTOM Research Worker (*).

(3) I.R.H.O. Research Worker (*).

(4) ORSTOM Technician (*).

(*) Address : Laboratoire de Physiologie végétale, Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM, 72, 74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

A mixed team, composed of research workers from both institutions, concentrated its efforts on improving the Rabéchaux-Martin method as regards dependability, yield and reduced duration of the various stages. Its application concerned a large number of selected trees. This paper gives the latest results.

I. — OBTAINING PRIMARY CALLUSES FROM LEAF FRAGMENTS

The planting material is composed of fragments of young leaves taken without damaging the apex, so that the tree can go on growing. About 400 explants can be taken from a 2-year-old plant (age counted from the time of germination) and more than 1 000 from an adult tree).

The first calluses appear about 60 days after culturing begins; at 100 days, the number of explants bearing calluses is virtually stationary. The calluses are then isolated and reseeded on new culture media.

The success rate per tree varies according to the original individual, the level on the leaf, and very significantly, with the phytohormone concentration.

Recent studies enabled both yields and the state of the calluses produced to be improved very considerably; they dealt with techniques for preparing the material for culturing, for isolation of the calluses, and also with the culture media and environmental conditions.

Primary calluses could be obtained both from adult trees and nursery plants. The proportion of explants from one tree bearing calluses at 100 days is rarely less than 20 p. 100. In some cases, the figure exceeds 60 p. 100.

The calluses appear at the level of the veins, and are formed of small cells closely stuck together (Fig. 1). They continue to grow on the original explant (Fig. 2). After isolation, though slow, growth continues through the successive subcultures (an increase of 50 p. 100 fresh matter can be observed in 2 months). The calluses are beige; in subculture, they acquire what is known as a « nodular » structure, and are indeed composed of tiny nodules of varying size linked to one another, the diameter of the largest being under 0.5 cm (Fig. 3). In some cases, this nodular aspect is masked, probably due to the presence of exfoliating tissues giving a more diffuse callus.

Apart from many calluses obtained in the laboratory during the early work on material of badly-known origin, between 1978 and 1980, 61 lots of calluses from 61 different trees were created in the laboratory; 53 trees come from 6 *E. guineensis* × *E. guineensis* crosses and 8 trees from 5 *E. guineensis* × *E. melanococca* interspecific hybrids.

Most of the calluses were maintained on an artificial medium to promote the formation of fast-growing tissue cultures.

II. — PRODUCTION OF FAST-GROWING TISSUE CULTURES

One of the stages leading to regeneration of young oil palm plants by vegetative propagation in vitro is the obtainment of fast-growing tissue cultures.

Placed on appropriate media, some of the calluses develop (Fig. 4) in a form which we have called fast-growing tissue cultures (FGC) as opposed to primary calluses. For most of them, the doubling time of fresh matter varies from 10 to 20 days depending on the culture considered and the medium used. However, for some of them, this period is much longer and may reach 30 or even 60 days.

The aspect and structure of FGC cultures are very different from those of primary calluses. They are characterised by paler colour, a light and airy structure, slightly granular (Fig. 5) and great friability when touched. In section, the FGC structure includes dispersed banks of meristematic cells, large cells and lacunae (Fig. 6).

The first tissue cultures obtained in the laboratory needed 2-3 years to become established; since then, improvements in the treatment of the leaf explants and culturing techniques in general, as well as modifications in the composition of the culture media, have enabled this period to be considerably reduced. In most cases, under the above conditions, it takes 6-12 months from the start of culturing of the explants. This phenomenon, once rare, has become common.

In 1979-1980, 90 FGC strains were obtained from 22 trees. Thus, for 61 trees placed in culture between 1978 and 1980, and which gave

primary calluses, 22 have produced FGC to date. Many calluses were obtained too recently to show transformation into FGC. This collection of fast-growing tissues may constitute the basic material for regenerating plantlets.

III. — EMBRYOGENESIS

For a given clone, once the quantity of tissue is sufficient, we go on to the next phase.

The tissues are placed into new culture conditions: at the end of a variable period, white formations with clearly-defined borders appear (Fig. 7). They polarise, and become chlorophyllian (Fig. 8). These forms are independent of the adjacent tissues. Structurally, they closely resemble true *Elaeis* embryos [Vallade, 1965]. In effect, they have a vascularized cotyledonary lamina, clearly individualised, and have differentiated what can be likened to a cauline pole and a radicular pole (Fig. 9A and B). These formations seem to correspond to embryoids and the phenomenon has all the characteristics of somatic embryogenesis [Reinert, 1973].

Such embryoids have been obtained from *E. guineensis* as well as from trees from *E. guineensis* × *E. melanococca* interspecific hybrids.

IV. — OBTAINMENT OF PLANTLETS

Once the embryoids formed on the fast-growing tissues have reached a certain size, they are isolated and seeded on a medium which stimulates their development. Figure 10 shows different stages of development.

In some cases, this seeding leads to a phenomenon of multiplication which enables several young leafed plants to be obtained from a single isolated visible embryoid (Fig. 11).

After roughly 2 months, the aerial part reaches about 2 cm. Some individuals have leaves and roots and constitute complete plants at this stage; many others need additional rooting treatment. As a result of this treatment, all the plants have large adventitious roots within 3 weeks (Fig. 12). Culture of the plantlets in vitro is continued until they are large enough (leaf length 10 cm) to be transferred to non-axenic conditions (Fig. 13). Both by the quantity of tissue which can be obtained because of the proliferation of FGCs and the autopropagation faculty of embryoids, the mass production of plantlets is quite possible (Fig. 14). Thanks to the development of a treatment leading to active rhizogenesis, the young plants now produced can continue to develop satisfactorily after they are returned to normal growing conditions.

Many plantlets from in vitro culture were sent to several countries, in particular the La Me Station in the Ivory Coast. They were first placed in the pre-nursery then the nursery (Fig. 15), before being field planted.

The first of them, derived from embryoids obtained in 1976, were planted in June 1978 in La Me. The growth characteristics and morphological appearance of the trees seem completely normal 2 years later (Fig. 16). Their caryotype conforms completely ($2n = 32$) and the first inflorescences appeared in July 1980.

CONCLUSION

Somatic embryogenesis of the oil palm seems to be mastered, and enables clones of individuals from specific mother stocks to be produced.

Work continues at Bondy, to confirm the repeatability of the phenomenon, to reduce its cost and to shorten the time taken to carry it out. It is known that in vitro culture conditions, enabling somatic embryos to be obtained, can lead to modification of the genome or its expression, producing individuals not conforming to the original material. Though the first results have proved highly satisfactory, the risk remains. The shorter the time spent on artificial media, the lower the risk. The results of Pannetier et al. [1981] show that encouraging progress has been made along this path.

Acknowledgments. — We wish to thank the La Me Station (Ivory Coast) for supplying planting material. We also wish to thank Messrs. Schwendiman and P. Pallares, from the GERDAT Cytogenetics Laboratory, who helped us prepare the histological sections, and Mr. J. Lortic from the ORSTOM Teledetection Service, who advised us on the photography.

La propagación vegetativa *in vitro* de la palma africana por embriogénesis somática

J. AHÉE (4), P. ARTHUIS (3), G. CAS (4), Y. DUVAL (3), G. GUÉNIN (4), J. HANOWER (2), P. HANOWER (2), D. LIEVOUX (4), C. LORET (1), B. MALAURIE (2), C. PANNETIER (3), D. RAILLOT (4), C. VARECHON (2) y L. ZUCKERMAN (4)

INTRODUCCIÓN

La realización de la reproducción vegetativa de la palma africana, que es una planta perenne y algáma de reproducción estrictamente sexual, presenta, debido a su gran interés económico, una ventaja evidente para la multiplicación de los individuos con caracteres excepcionales.

Por no producirse el fenómeno de un modo natural, se acometió trabajos que utilizan las posibilidades que ofrecen los métodos de cultivo de tejidos *in vitro*. Esta vía permite teóricamente conseguir un número no limitado de plantones a partir de un pedazo de tejido. El material obtenido presenta las mayores garantías sanitarias posibles. Los tejidos conservados bajo un volumen reducido permiten constituir « bancos » de material genético mucho más cómodos, para la utilización y la conservación, que las colecciones de individuos adultos en el campo. Se gana un tiempo notable en la valorización de los resultados de la selección y el material vegetal proporcionado a las plantaciones es mucho más interesante, tanto a nivel de la producción como de la homogeneidad.

Se logró resultados alentadores. Entre los trabajos realizados en el extranjero, conviene citar los de Staritsky [1970], Jones [1974], Corley [1977], Corley *et al.* [1977, 1979].

En Francia, estudios realizados en el Laboratorio de Fisiología vegetal de los Servicios científicos centrales del ORSTOM en Bondy, dentro de un convenio ORSTOM-I.R.H.O., condujeron a la elaboración de un procedimiento de producción de jóvenes plántulas a partir de tejidos foliares [Rabéchault y Martin, 1976].

Un equipo conjunto, formado por investigadores que pertenecen a ambos organismos, orientó sus trabajos en torno a la mejora del procedimiento de Rabéchault y Martin desde el punto de vista de la fiabilidad, del rendimiento, de la reducción de la duración de las diversas etapas. La aplicación abarcó un alto número de árboles seleccionadas. La presente publicación recapitula los resultados logrados.

I. — OBTENCIÓN DE CALLOS PRIMARIOS A PARTIR DE FRAGMENTOS DE HOJAS

El material vegetal lo constituyen fragmentos de hojas jóvenes tomadas sin lesionar el ápex, de tal modo que el brote del árbol aún sea posible. El número de explantes puede ser de aproximadamente 400 a partir de un plantón de 2 años (contándose la edad a partir de la germinación), y mayor de 1 000 a partir de un árbol adulto.

Los primeros callos aparecen poco más o menos a los 60 días después de la puesta en cultivo; a los 100 días, el número de explantes portadores de callos ya no evoluciona casi. Entonces se los aísla y trasplanta en nuevos medios de cultivo.

El porcentaje de éxito por árbol varía según el individuo de origen, el nivel en la hoja, y de modo muy significativo, con la concentración en fitohormonas.

Trabajos recientes han permitido mejorar de un modo muy notable los rendimientos y el estado de los callos. Se refieren a las técnicas de preparación del material, de puesta en cultivo, de aislamiento de los callos, y también a los medios de cultivo y a las condiciones de medio ambiente.

Se ha podido conseguir callos primarios tanto a partir de árboles adultos como de plantones de semillero. El porcentaje de explantes procedentes de un árbol y portadores de callos a los 100 días muy pocas veces es menor de un 20 %. En cierto número de casos estos porcentajes superan el 60 %.

Los callos aparecen a nivel de las nervaduras; son formados por células muy pequeñas estrechamente unidas (Fig. 1). Prosiguen el crecimiento en el explante de origen (Fig. 2). Después del aislamiento este crecimiento lento (pudiéndose observar un crecimiento de un 50 % de materia fresca dentro de 2 meses) se prosigue durante los subcultivos sucesivos. Los callos son de un color amarillento. En el subcultivo adquieren una estructura llamada « nodular »; en efecto están formados por pequeños nódulos unidos unos a otros, de un tamaño variable, no pasando los más gordos de 0,5 cm de diámetro (Fig. 3). En algunos casos este aspecto nodular queda oculto, probablemente por la presencia de tejidos descamantes que producen un callo más difuso.

Fuera de numerosos callos obtenidos en laboratorio en los primeros trabajos sobre material de origen poco conocido, se crearon en laboratorio 61 lotes de callos provenientes de 61 árboles distintos, 53 de los cuales procedían de 6 cruzamientos *E. guineensis* × *E. guineensis* y 8 procedían de 5 híbridos interespecíficos *E. guineensis* × *E. melanococca*.

Se mantuvo el conjunto de estos callos en un medio artificial para obtener la formación de cultivos de tejido de crecimiento rápido.

II. — PRODUCCIÓN DE CULTIVOS DE TEJIDO DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Una de las etapas que conducen a la regeneración de jóvenes plantas de palma aceitera por el método de propagación vegetativa *in vitro* es la obtención de cultivos de tejido de crecimiento rápido.

De colocarse en medios convenientes, algunos callos evolucionan (Fig. 4) en una forma que llamamos cultivos de tejido de crecimiento rápido (CCR) por oposición a los callos primarios. Para la mayoría de éstos el plazo de duplicación de la materia fresca varía de 10 a 20 días según el cultivo considerado y el medio utilizado. Ahora bien para cierto número de los mismos este plazo es mucho más largo, pudiendo llegar a 30 y hasta 60 días.

El aspecto y la estructura de los cultivos de crecimiento rápido son muy distintos de los callos primarios. Los caracteriza un color más claro, una estructura ligera y aireada algo granulosa (Fig. 5) y una gran friabilidad al tacto. En un corte la estructura de los CCR incluye macizos dispersos de células meristemáticas, de células de gran tamaño y de espacios lagunares (Fig. 6).

Los primeros cultivos de tejido obtenidos en el laboratorio necesitaban 2 a 3 años para establecerse; desde entonces mejoras a nivel del tratamiento de explantes foliares y de las técnicas de cultivo en general, y también modificaciones de la composición de los medios de cultivo, permitieron que este plazo fuera notablemente reducido. En la mayoría de los cultivos conseguidos en las condiciones mencionadas, este plazo viene a ser de 6 a 12 meses después de la puesta en cultivo de explantes. Por otra parte este fenómeno se ha hecho frecuente, cuando antes no lo era.

En los años 1979-1980 se obtuvo 80 cepas de CCR procedentes de 22 árboles. Así es cómo para 61 árboles puestos en cultivo desde 1978 y que dieron callos primarios, 22 hasta la fecha dieron cultivos de tejido de crecimiento rápido. Muchos callos son demasiado recientes, por lo que aún no se han transformado en CCR. Esta colección de tejidos de crecimiento rápido constituye el material inicial para la regeneración de las plantas jóvenes.

(1) Profesor en la Universidad de París, XI, responsable de la cuadrilla de investigadores ORSTOM-I.R.H.O. (*).

(2) Investigador ORSTOM (*).

(3) Investigador I.R.H.O. (*).

(4) Técnico ORSTOM (*).

(* Dirección: Laboratoire de Physiologie Végétale, Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM, 72-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

III. — EMBRIOGÉNESIS

Para un determinado clón, cuando la cantidad de tejido de crecimiento rápido es suficiente, se lleva a cabo la fase siguiente :

Se colocan los tejidos en nuevas condiciones de cultivo ; al cabo de un plazo variable aparecen formaciones blancas de contornos bien delimitados (Fig. 7) ; éstas se polarizan y se vuelven clorofílicas (Fig. 8). Tales formaciones son independientes de los tejidos adyacentes. Son muy parecidas por su estructura a unos verdaderos embriones de *Elaeis* [Vallade, 1965]. En efecto, poseen un limbo cotiledóneo vascularizado bien individualizado, habiendo diferenciado lo que se puede asimilar a un polo caulinar y un polo radicular (Fig. 9A y B). Estas formaciones corresponden al parecer a embrioides y el fenómeno muestra todas las características de una embriogénesis somática [Reinert, 1973].

Tales embrioides se obtuvieron tanto de *E. guineensis* como de árboles que pertenecen a híbridos interespecíficos *E. guineensis* × *E. melanococca*.

IV. — OBTENCIÓN DE PLANTAS JÓVENES

Cuando los embrioides formados en los tejidos de crecimiento rápido llegan a tener cierto tamaño, se los aísla y trasplanta en un medio que estimula su desarrollo. La figura 10 muestra diversas etapas de desarrollo.

A consecuencia de este trasplante se observa en cierto número de casos un fenómeno de multiplicación que permite lograr a partir de un solo embriode visible aislado varios plantones jóvenes con hojas (Fig. 11).

Después de un plazo de unos 2 meses, el aparato aéreo alcanza unos 2 cm. Algunos individuos tienen hojas y raíces, constituyendo en este estado plantones completos ; muchos otros deben experimentar un tratamiento complementario de arraigo. Después de este tratamiento todas las plantas muestran en un plazo de 3 semanas raíces adventicias grandes (Fig. 12). Se prosigue el cultivo de plántulas *in vitro* hasta que alcancen un tamaño suficiente (hoja de aproximadamente 10 cm de largo) para que se pueda trasladarlas en condiciones no axénicas (Fig. 13). Tanto por la calidad de tejidos que se puede obtener mediante la proliferación de CCR como por el poder de autopropagación de los embrioides, es muy posible la

producción masiva de plántulas (Fig. 14). Mediante la puesta a punto del tratamiento que provoca una rizogénesis activa, los jóvenes plantones que ahora se producen pueden seguir desarrollándose de modo satisfactorio después de volver a las condiciones de cultivo acostumbradas.

Se enviaron muchas plántulas procedentes de cultivos *in vitro* a diversos países, especialmente en la estación de La Mé en Costa de Marfil. Se las colocó primero en el previvero y luego en el vivero (Fig. 15) antes de sembrarlas en el campo.

Las primeras de éstas procedían de embrioides logrados en 1976, y fueron sembradas en La Mé en junio 1978. Las características de crecimiento y el aspecto morfológico de los árboles parecen muy normales después de 2 años (Fig. 16) ; su cariotipo es muy conforme ($2n = 32$) y las primeras inflorescencias aparecieron en julio de 1980.

CONCLUSIÓN

La embriogénesis somática de la palma africana parece dominada y permite lograr clones de individuos provenientes de pies madres definidos.

Se están prosiguiendo las labores en Bondy, con miras a confirmar el carácter repetitivo del fenómeno, disminuyendo su costo y reduciendo los plazos de realización. Es un hecho conocido el que las condiciones de cultivo *in vitro*, que permiten conseguir embriones somáticos, pueden traer modificaciones del genoma o de su funcionamiento, produciéndose individuos no conformes al material inicial. A pesar de ser muy satisfactorios los resultados hasta la fecha, sigue el riesgo. Éste será tanto más reducido cuanto más breves los mantenimientos en medios artificiales. Los resultados de Pannetier *et al.* [1981] muestran que se hizo progresos alentadores en este aspecto.

Agradecimientos. — *Le agradecemos a la estación de La Mé (Costa de Marfil) el suministro del material vegetal. Nuestros agradecimientos se dirigen también a los Sres J. Schwendiman y P. Pallares, del Laboratorio de Citogenética del GERDAT, que nos ayudaron en la preparación de los cortes histológicos y al Sr M. J. Lortic, del servicio de teledetección del ORSTOM, quien nos aconsejó en la realización de fotografías.*

Extrait de Oléagineux, 36^e année, n° 3, Mars 1981, p. 113-118.