

R 376 55 ex 1

## Les nouvelles méthodes de conservation *ex situ*

Florent ENGELMANN \*

*Résumé* : La culture *in vitro* est largement utilisée pour la conservation *ex situ* des espèces végétales. Pour la conservation à moyen terme, une réduction de la température de culture est employée en routine. De nouvelles techniques (atmosphères contrôlées, encapsulation, dessiccation) sont expérimentées. La conservation à long terme est assurée par la cryoconservation (azote liquide, -196 °C). Si elle a été expérimentée sur plus de 70 espèces végétales, son application est encore exceptionnelle. De nouvelles méthodes (encapsulation/déshydratation, vitrification, dessiccation, emploi d'un congélateur programmable) devraient permettre de faciliter son développement futur.

*Mots-clés* : conservation, culture *in vitro*, atmosphères contrôlées, encapsulation, dessiccation, vitrification, congélateur ménager.

*Abstract* : *In vitro* culture is largely employed for *ex situ* conservation of plant species. For medium-term preservation, temperature reduction is routinely used. New techniques (controlled atmospheres, encapsulation, desiccation) are experimented. Long-term conservation is ensured by cryopreservation (liquid nitrogen, -196 °C). Cryopreservation has been experimented with more than 70 plant species. However, its application still remains exceptional. New methods (encapsulation/dehydration, vitrification, desiccation, use of domestic freezer) should facilitate its future development.

*Key words* : conservation, *in vitro* culture, controlled atmospheres, encapsulation, desiccation, vitrification, domestic freezer.

### Introduction

Les espèces végétales ont été divisées en deux catégories, en relation avec les possibilités de leur conservation (Roberts, 1973) :

- les espèces à graines orthodoxes, qui peuvent supporter une déshydratation jusqu'à 5 % ou moins par rapport à leur poids sec. Leur viabilité

\* ORSTOM, Laboratoire de Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, 911 av. Agropolis, 34032 Montpellier cedex 01, France.

20 AVR. 1993

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 37655 ex 1

Cote : B

est importante et peut être prolongée en les conservant à basse température ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

— les espèces à graines récalcitrantes qui sont généralement très riches en eau et ne supportent pas la dessiccation. Ce sont principalement des espèces d'origine tropicale ou sub-tropicale. Elles ne peuvent être conservées qu'à une humidité et une température élevées, car elles sont généralement sensibles au froid. Leur viabilité est réduite (quelques semaines à quelques mois), même dans les conditions optimales de conservation. Ce groupe de plantes comprend de nombreuses espèces d'importance économique, comme le palmier à huile, le cocotier, le caféier, ainsi que de nombreuses espèces ligneuses.

De plus, la conservation des espèces à multiplication végétative, telles que le manioc, la pomme de terre ou l'igname pose également des problèmes importants.

La conservation *in situ* est devenue pratiquement impossible, du fait de la disparition des étendues non exploitées. La conservation *ex situ* est difficile à réaliser, à cause de la taille des échantillons à conserver, pour avoir une bonne représentation de la diversité génétique des espèces. De plus, les coûts d'entretien de telles collections sont élevés. Enfin, le matériel végétal reste exposé aux pathogènes et aux accidents climatiques.

Au cours des dernières années, les techniques de culture *in vitro* ont été considérablement développées, puisqu'elles ont été appliquées à plus de 1 000 espèces végétales différentes. Elles sont d'un grand intérêt pour la conservation du matériel génétique, grâce aux avantages qu'elles présentent : les taux de multiplication sont élevés, les plantes sont maintenues dans un système aseptique exempt de bactéries, champignons ou virus, dans un espace de stockage réduit. L'érosion génétique est donc théoriquement réduite à zéro. Enfin, les coûts d'entretien des collections *in vitro* sont considérablement diminués.

Les méthodes utilisées diffèrent selon la durée de stockage recherchée. Pour une conservation à moyen terme (quelques mois à 1-2 ans), l'objectif est de ralentir la croissance en modifiant les conditions de culture, principalement la température. Pour une conservation à long terme (plusieurs dizaines d'années), la cryoconservation (azote liquide,  $-196^{\circ}\text{C}$ ) est aujourd'hui la seule méthode utilisable. A cette température, toutes les divisions cellulaires sont arrêtées et les événements métaboliques bloqués. Les cultures peuvent donc être conservées sans modification ni altération pendant une durée théoriquement illimitée. Sur un plan pratique, le matériel est conservé dans un faible volume, à l'abri des contaminations et avec un entretien réduit.

De nombreuses synthèses ont été publiées sur les techniques classiques de conservation utilisant la culture *in vitro* (Kartha, 1985; Withers, 1985a; Aitken-Christie et Singh, 1987; Wilkins *et al.*, 1989; Engelmann, 1991a, 1992a). Dans cet article, nous présenterons rapidement ces techniques ainsi que leur développement actuel. Nous insisterons sur les nouvelles méthodes expérimentées pour la conservation à moyen et à long terme des ressources génétiques végétales.

## Conservation à moyen terme

Les méthodes de conservation à moyen terme s'appliquent principalement à des microboutures qui représentent le type d'explants généralement employé pour la multiplication à grande échelle. Nous présenterons d'abord les techniques mises au point pour ce type de matériel, puis les nouvelles méthodes expérimentées non seulement avec des microboutures mais également avec des embryons somatiques.

### Techniques classiques de conservation *in vitro*

La réduction de la croissance est généralement obtenue en diminuant la température de culture. Elle est abaissée jusqu'à  $0-4^{\circ}\text{C}$  pour de nombreuses espèces tempérées. Cependant, dans le cas des espèces tropicales qui sont sensibles au froid, des températures de l'ordre de  $18$  à  $22^{\circ}\text{C}$  sont utilisées. Une diminution ou une suppression de l'éclairage peuvent être réalisées conjointement, selon les espèces.

Le milieu de culture peut être modifié de plusieurs manières. La concentration en éléments minéraux et/ou en sucre peut être diminuée. La croissance peut être ralentie en additionnant au milieu des substances ayant des propriétés osmotiques telles que le mannitol ou le saccharose. Des agents retardateurs de la croissance comme l'acide abscissique sont également employés. Enfin, d'autres substances comme le charbon actif ont parfois des effets positifs sur le ralentissement de la croissance.

L'état physiologique des explants a des conséquences importantes sur les possibilités de conservation du matériel. Ainsi, la présence d'un système racinaire améliore généralement les résultats. Suivant les espèces, les plantes doivent être placées en conservation immédiatement après le dernier repiquage, ou seulement après un certain délai.

### Nouvelles techniques de conservation à moyen terme

Trois nouvelles techniques sont principalement utilisées pour la conservation à moyen terme : les modifications de l'environnement gazeux, l'encapsulation, la dessiccation.

### Modifications de l'environnement gazeux

Le ralentissement de la croissance peut être atteint en modifiant la quantité d'oxygène disponible pour les cultures. Plusieurs méthodes ont été mises au point dans cet objectif. La plus simple consiste à recouvrir les tissus sous une couche d'huile minérale. Cette technique a été employée pour la première fois par Caplin (1959) avec des cals de carotte, puis réutilisée récemment par Augereau *et al.* (1986) avec des cals de *Catharanthus* et par Moriguchi *et al.* (1988) avec des cals de vigne. Quelques essais ont également été réalisés avec des structures organisées comme des microboutures (Chatti-Dridi, 1988; Jouve *et al.*, 1991). Cependant, si la réduction de croissance

est effective, des problèmes de vitrification des explants pendant la conservation ont été notés. De plus, lors du retour aux conditions standard de culture, la reprise de croissance est souvent très lente et des nécroses partielles ou totales des explants sont observées. Cette technique semble donc convenir uniquement pour la conservation de structures indifférenciées.

Une autre solution consiste à stocker les explants dans des atmosphères dont la teneur en oxygène est précisément déterminée, en utilisant des atmosphères contrôlées. Les premiers essais ont été réalisés par Bridgen et Staby (1981) sur des plantules de tabac et de chrysanthème. Elles ont pu être conservées pendant 6 semaines dans une atmosphère contenant 1,3 % d'oxygène, sans que l'on observe de modifications de leur croissance ultérieure. Cette technique a été réemployée récemment par Engelmann (1990) dans le cas d'embryons somatiques de palmier à huile. Après 4 mois de conservation sous 1 % d'oxygène, une reprise rapide des cultures ainsi conservées a été obtenue, alors que les témoins stockés dans les conditions standard avaient subi des nécroses très importantes. Cette méthode semble particulièrement intéressante dans le cas des espèces tropicales qui sont très sensibles au froid. En effet, le ralentissement de la croissance est obtenu sans avoir à diminuer la température de culture.

#### Encapsulation

Cette technique est employée aujourd'hui pour la production des « semences artificielles », en enrobant des embryons somatiques dans des billes d'alginate. Quelques essais préliminaires ont été réalisés récemment en utilisant cette technologie pour la conservation à moyen terme. Ainsi, des apex de mûrier et des embryons somatiques de santalier encapsulés ont pu être stockés pendant 45 jours et reprendre une croissance normale (Bapat *et al.*, 1987; Bapat et Rao, 1988). La durée de conservation a été étendue à 4 mois avec des embryons somatiques de *Podophyllum hexandrum* (Arumugam et Bhojwani, 1990). Cette technique pourrait être intéressante dans une optique de conservation à moyen terme. En effet, la protection conférée aux explants par l'encapsulation devrait permettre d'augmenter leur résistance à la déshydratation et aux basses températures et d'accroître ainsi leurs potentialités de conservation. De plus, sur un plan pratique, des embryons ou des apex encapsulés devraient être des structures faciles à stocker.

#### Dessiccation

Un nombre limité d'essais a été effectué en stockant du matériel végétal partiellement déshydraté. Nitzsche (1980) a pu conserver pendant un an des cals de carotte et obtenir leur reprise de croissance. Plus récemment, McKersie *et al.* (1990) ont déshydraté des embryons somatiques de *Medicago sativa* jusqu'à 15 % de teneur en eau et les ont conservés pendant 8 mois à température ambiante. Ces auteurs indiquent qu'un prétraitement à l'acide abscissique semblait améliorer la tolérance à la dessiccation des embryons, ce qui pourrait permettre d'augmenter la durée de leur conservation.

#### Utilisation des techniques de conservation à moyen terme

Les nouvelles techniques décrites précédemment n'en sont encore qu'au stade de l'expérimentation. Par contre, les méthodes traditionnelles de conservation à moyen terme sont aujourd'hui employées en routine dans de

nombreux laboratoires industriels et dans des centres régionaux ou internationaux de conservation des ressources génétiques. Cependant, l'entretien de collections de taille importante, même si les intervalles entre les repiquages peuvent être considérablement augmentés, pose des problèmes considérables. Il est donc nécessaire de développer des méthodes qui réduisent au minimum l'entretien du matériel conservé. La cryoconservation est une solution de choix.

## La cryoconservation

### Protocole classique de cryoconservation

Un protocole classique de cryoconservation comprend une série d'étapes successives qui doivent être définies pour chaque espèce : choix du matériel de départ, prétraitement, congélation, conservation, réchauffement, post-traitement. Ces différentes étapes sont analysées en détail dans plusieurs articles de synthèse (Kartha, 1985; Dereuddre et Engelmann, 1987). Nous les présenterons rapidement et insisterons sur les nouvelles méthodes expérimentées.

### Choix du matériel de départ

En règle générale, le matériel doit être le plus jeune et le plus méristématique possible. En effet, les cellules sont alors les plus aptes à résister à la congélation. Elles sont de petite taille, peu différenciées, ne contiennent que peu de vacuoles, donc une faible quantité d'eau, leur cytoplasme est dense et leur rapport nucléo-cytoplasmique élevé.

L'état physiologique du matériel est très important. Dans le cas de suspensions cellulaires, le matériel en phase exponentielle de croissance est plus susceptible de résister à la congélation (Withers, 1985b). Harding *et al.* (1991) indiquent qu'une durée de culture prolongée en conditions *in vitro* peut réduire la résistance des explants à la congélation dans l'azote liquide.

### Prétraitement

Le prétraitement correspond à une culture dans des conditions qui préparent le matériel végétal à la congélation. Il est effectué en présence de substances cryoprotectrices telles que le saccharose, le sorbitol, le mannitol, le diméthylsulfoxyde ou le polyéthylène glycol, qui diffèrent entre elles par leur structure et leur poids moléculaire. Leur mode d'action est encore mal connu : elles ont un effet osmotique et déshydratent les cellules, mais agissent également en protégeant la structure des membranes et certains sites enzymatiques. Pour chaque espèce, il faut déterminer la nature des cryoprotecteurs, leur concentration ainsi que la durée du prétraitement.

### Congélation

Deux types de congélation peuvent être réalisés : la congélation rapide, en une seule étape, ou la congélation lente, en deux étapes. Cette dernière doit être effectuée à l'aide d'un congélateur programmable.

Lors d'une congélation rapide, les explants sont immergés directement dans l'azote liquide. L'eau cristallise en microcristaux d'une taille non dommageable pour l'intégrité cellulaire. Au cours d'une congélation programmée, le milieu extracellulaire cristallise en premier et les cellules se déshydratent progressivement pendant le refroidissement lent. Les cellules doivent être suffisamment déshydratées pour que l'eau résiduelle ne cause pas de dégâts, mais pas trop pour éviter la toxicité due à l'élévation de la concentration des solutés internes.

Deux critères doivent être déterminés plus ou moins précisément selon les espèces : la vitesse de congélation et la température de fin de congélation programmée, ou température de prérefroidissement.

### Conservation

La durée de conservation est théoriquement illimitée, à condition que les explants restent à la température de l'azote liquide. Les dégâts causés par les radiations naturelles, auxquelles le matériel reste exposé, ne deviendraient irréparables qu'après des durées de stockage de plusieurs centaines d'années (Ashwood-Smith et Friedmann, 1979).

### Réchauffement

Le réchauffement est généralement réalisé rapidement, afin d'éviter la recristallisation des microcristaux en cristaux d'une taille dommageable pour les cellules, si la remontée en température est trop lente.

### Post-traitement

Le post-traitement consiste en une culture du matériel dans des conditions qui permettent la reprise dans des conditions optimales. Les substances cryoprotectrices qui peuvent devenir toxiques si elles restent trop longtemps en contact avec les explants, sont progressivement éliminées. Les cultures sont parfois repiquées sur des milieux progressivement moins concentrés en saccharose, afin d'atténuer le choc osmotique. La composition du milieu de culture est parfois transitoirement modifiée, par adjonction de substances de croissance ou suppression de certains éléments minéraux.

### Applications actuelles de la cryoconservation

Aujourd'hui, la résistance à la congélation dans l'azote liquide a été prouvée chez plus de 70 espèces végétales sous la forme de cellules, cals, méristèmes, embryons somatiques et zygotiques (Kartha, 1985 ; Dereuddre

et Engelmann, 1987 ; Engelmann, 1992a). Si la cryoconservation peut être considérée comme une technique de routine, ou du moins facile à mettre en œuvre dans le cas de suspensions cellulaires (Withers, 1985b), il n'en est pas de même pour des structures de taille plus importante et plus différenciées, comme les méristèmes ou les embryons.

L'application à grande échelle de la cryoconservation reste à l'heure actuelle extrêmement limitée. Son premier développement concerne les embryons somatiques de palmier à huile, pour lesquels plus de 150 clones ont aujourd'hui été cryoconservés dans cinq laboratoires différents, en Afrique, en Asie et en France (Engelmann, 1991b). Encore s'agit-il dans cet exemple d'essais à grande échelle plutôt que d'une utilisation en routine. Un programme de même ampleur est actuellement en cours de réalisation sur le manioc au CIAT en Colombie (IBPGR, 1990).

### Nouvelles techniques de cryoconservation

L'un des objectifs de ces nouvelles techniques est de chercher à simplifier les protocoles classiques de cryoconservation. On peut distinguer 4 types de nouveaux procédés : l'encapsulation/déshydratation, la vitrification, la dessiccation et l'utilisation de congélateurs domestiques.

### L'encapsulation/déshydratation

Cette technique dérive de la technologie des semences artificielles. Elle a été appliquée à plusieurs espèces telles que la pomme de terre (Fabre *et al.*, 1990), la vigne (Plessis *et al.*, 1991), le poirier (Scottet *et al.*, 1991), la carotte (Dereuddre *et al.*, 1991). Il semble que l'encapsulation protège les structures et permette ainsi de les soumettre à des traitements qui seraient létaux avec des structures non encapsulées. Les explants encapsulés sont cultivés pendant plusieurs jours dans des milieux liquides contenant des quantités élevées en saccharose, déshydratés partiellement sous la hotte à flux laminaire avant leur congélation. Des taux de reprise élevés peuvent être obtenus après le réchauffement.

### Vitrification

Cette technique a été développée récemment par plusieurs équipes (Uragami *et al.*, 1989 ; Langis *et al.*, 1989 ; Langis et Steponkus, 1990 ; Sakai *et al.*, 1990 ; Towill, 1990) avec des suspensions cellulaires, des protoplastes, des embryons somatiques et des méristèmes de plusieurs espèces. Au cours de la vitrification, les explants sont congelés très rapidement, de sorte que l'eau vitrifie, c'est à dire forme une structure vitreuse amorphe. Il n'y a donc pas formation de glace, généralement dommageable pour les cellules. La réussite d'un procédé de vitrification nécessite l'emploi de concentrations très élevées en substances cryoprotectrices qui sont très toxiques. La durée de contact des explants avec la solution cryoprotectrice doit donc être déterminée très précisément. De même, la dilution du mélange cryoprotecteur, après le réchauffement, est une opération délicate. Il semble donc qu'à

l'heure actuelle, la complexité du prétraitement et du post-traitement rend difficilement envisageable l'utilisation en routine d'une telle technique dans un avenir proche.

### La dessiccation

La dessiccation a été expérimentée récemment par Uragami *et al.* (1990) sur des fragments de tige d'asperge et par Shiminoshi *et al.* (1991) sur des embryons somatiques de concombre. Les explants sont d'abord cultivés pendant des durées variables sur des milieux enrichis en saccharose, puis déshydratés sous la hotte à flux laminaire ou au moyen de silicagel. Ils sont ensuite congelés rapidement dans l'azote liquide puis remis en culture sur le milieu standard après leur réchauffement. Cette technique se rapproche de celle utilisée pour la majorité des embryons zygotiques (Engelmann, 1992b). Elle se caractérise par sa simplicité et mériterait d'être expérimentée sur un grand nombre d'espèces.

### L'utilisation d'un congélateur ménager

Dans cette technique, les étapes successives d'un protocole classique sont effectuées. Toutefois, la congélation est réalisée non plus en utilisant un congélateur programmable mais en plaçant les explants à  $-20$  ou  $-30$  °C, dans l'enceinte d'un congélateur ménager. Ce procédé a été expérimenté avec succès sur des suspensions embryogènes de caféier et de carotte (Tessereau *et al.*, 1990). Des résultats prometteurs ont été obtenus avec les matériels testés. Cependant, elle n'est peut être pas généralisable, du fait des conditions de refroidissement extrêmement précises requises par de nombreuses espèces végétales.

### Utilisation potentielle des nouvelles techniques

Les techniques décrites précédemment présentent toutes des avantages potentiels mais ne pourront en aucun cas se substituer aux techniques standard de cryoconservation. Elles devraient cependant permettre d'offrir des possibilités supplémentaires pour des matériels récalcitrants à la congélation classique et, dans certains cas, de faciliter le développement de la cryoconservation dans des situations où l'emploi d'équipements sophistiqués n'est pas réalisable.

### Conclusion

En conclusion, des travaux importants ont été réalisés concernant la conservation à moyen et long terme des ressources génétiques végétales. Cependant, de nombreux problèmes doivent encore être résolus avant de pouvoir envisager l'utilisation en routine des techniques expérimentées. Il

est nécessaire d'évaluer le matériel génétique afin de conserver un échantillon représentatif de la diversité des espèces concernées. De plus, les techniques de culture *in vitro* doivent être optimisées dans de nombreux cas, avant que l'on puisse aborder les aspects de conservation. Enfin, il convient d'examiner, dans chaque situation, la où les techniques les plus pertinentes à rechercher pour assurer dans des conditions optimales la conservation du matériel génétique d'une espèce donnée. Ainsi, dans les pays en développement qui détiennent une part importante de la diversité génétique, les techniques à développer doivent être mises en adéquation avec les moyens existant localement.

Si la conservation à moyen terme est utilisable en routine dans de nombreux cas, il n'en est pas de même pour la cryoconservation. La résistance à la congélation dans l'azote liquide a été prouvée pour de nombreuses espèces végétales. Cependant, son application reste aujourd'hui limitée à de petites collections de laboratoire et son développement à grande échelle exceptionnel. La mise au point de méthodes de cryoconservation requiert généralement de longues recherches ainsi qu'un équipement sophistiqué. Dans ce contexte, l'émergence de nouvelles techniques telles que l'encapsulation/déshydratation, la dessiccation, la vitrification ou l'utilisation de congélateurs ménagers permet d'augmenter les possibilités et d'accélérer l'obtention de résultats.

L'intérêt montré à la fois par les instituts de recherche nationaux et internationaux et les compagnies privées de biotechnologie pour les problèmes de conservation entraînent une augmentation significative des activités dans ce domaine. Des techniques performantes et éprouvées devraient donc pouvoir être proposées à moyen terme pour assurer la conservation des ressources génétiques d'un nombre important d'espèces végétales.

### Bibliographie

- AITKEN-CHRISTIE J. et SINGH A.P., 1987 — Cold storage of tissue cultures. In *Cell and Tissue Culture in Forestry*, vol. 2, Bonga J.M. et Durzan D.J. (eds), Martinus Nijhoff, Dordrecht : 285-303.
- ARUMUGAM N. et BHOJWANI S.S., 1990 — In vitro propagation of *Podophyllum hexandrum* Boyle via somatic embryogenesis. In *Abstr. VIIth Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Amsterdam : 243.
- ASHWOOD-SMITH M.J. et FRIEDMANN G.B., 1979 — Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time and X-irradiation on mammalian cells preserved at  $-196$  °C in dimethylsulfoxide. *Cryobiology*, 16 : 132-140.
- AUGEREAU J.M., COURTOIS D. et PETIARD V., 1986 — Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer. *Plant Cell Rep.*, 5 : 372-376.
- BAPAT V.A. et RAO P.S., 1988 — Sandalwood plantlets from « synthetic seeds ». *Plant Cell Rep.*, 7 : 434-436.
- BAPAT V.A., MATHRE M. et RAO P.S., 1987 — Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoot buds. *Plant Cell Rep.*, 6 : 393-395.

- BRIDGEN M.P. et STABY G.L., 1981 — Low pressure and low oxygen storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum morifolium* tissue cultures. *Plant Sci. Lett.*, **22**: 177-186.
- CAPLIN S.M., 1959 — Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures. *Am. J. Bot.*, **46**: 324-329.
- CHATTI-DRIDI B., 1988 — *Expériences préliminaires sur la conservation à court terme et l'amélioration de la micropropagation in vitro dans le cas du pêcher (Prunus persica)*. Mémoire de fin d'études, ENSH Versailles, 87 p.
- DEREUDDRE J. et ENGELMANN F., 1987 — The use of cryopreservation for setting up banks of plant germplasm. In *Actes Coll. Franco-Britannique IAPTC*, Angers 8-9 oct. 1987: 48-78.
- DEREUDDRE J., BLANDIN S. et HASSEN N., 1991 — Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: I. Effects of preculture. *Cryo Lett.*, **12**: 125-134.
- ENGELMANN F., 1990 — Utilisation d'atmosphères à teneur en oxygène réduite pour la conservation de cultures d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **310**, Sér. III: 679-684.
- ENGELMANN F., 1991a — *In vitro* conservation of horticultural species. *Acta Hort.*, sous presse.
- ENGELMANN F., 1991b — Le développement actuel de la cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile. In *Proc. XVIII Cong. Int. du Froid*, Montréal, 10-17 août 1991: 305
- ENGELMANN F., 1992a — *In vitro* conservation of tropical plant germplasm — a review. *Euphytica*, sous presse.
- ENGELMANN F., 1992b — Cryopreservation of embryos. In *Proc. XIIIth EU-CARPIA Cong., Reproductive Biology and Plant Breeding*, Angers, 6-10 juillet 1992, sous presse.
- FABRE J. et DEREUDDRE J., 1990 — Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Lett.*, **11**: 413-426.
- HARDING K., BENSON E.E. et SMITH H., 1991 — The effects of *in vitro* culture period on the recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum*. *Cryo-Lett.*, **12**: 17-22.
- IBPGR, 1990. *Annual Report*, Rome: 34.
- JOUE L., ENGELMANN F. et CHARRIER A., 1991 — Effets de l'hypoxie et de la température sur la conservation *in vitro* de pousses feuillées de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé*, **XXXV**: 205-210.
- KARTHA K.K., 1985 — *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- LANGIS R., SCHNABEL B., EARLE, E.D. et STEPONKUS P.L., 1989 — Cryopreservation of *Brassica napus* suspensions by vitrification. *Cryo-Lett.*, **10**: 421-428.
- LANGIS R. et STEPONKUS P.L., 1990 — Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. *Plant Physiol.*, **92**: 666-671.
- Mc KERSIE B.D., SENARATNA T., BOWLEY S.R., BROWN D.C., KIELLY A., KROCHKO J.E. et BEWLEY J.D., 1990 — Artificial seeds application in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). In *Abstr. VIIth Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Amsterdam: 259.
- MORIGUCHI T., KOZAKI I., MATSUTA N. et YAMAKI S., 1988 — Plant regeneration from grape callus stored under a combination of low temperature and silicone treatment. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **15**: 67-71.

- NITZSCHE E.H., 1980 — One year storage of dried carrot callus. *Z. Pflanzenphysiol.*, **100**: 269-271.
- PLESSIS P., LEDDET C. et DEREUDDRE J., 1991 — Résistance à la déshydratation et à la congélation dans l'azote liquide d'apex enrobés de vigne (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay). *C.R. Acad. Sci.*, **313**, Sér. III: 373-380.
- ROBERTS E.H., 1973 — Predicting the viability of seeds. *Seed Sci. Technol.*, **1**, 499-514.
- SAKAI A., KOBAYASHI S. et OYIAMA I., 1990 — Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.*, **9**: 30-33.
- SCOTTEZ C., GAUDIN N., JOULIE C., ARNAUD Y. et DEREUDDRE J., 1991 — Cryopreservation of pear shoot-tips after encapsulation-dehydration. In *Proc. 28th Ann. Meeting of the Society for Cryobiology*, Leuven, Belgium, 7-12 July: 59.
- SHIMINOSHI K., ISHIKAWA M., SUZUKI S. et OOSAWA K., 1991 — Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method. *Japan J. Breeding*, **41**: 347-352.
- TESSERAU H., LECOUTEUX C., FLORIN B., SCHLIENGER C. et PETIARD V., 1990 — Use of a simplified freezing process and dehydration for the storage of embryogenic cell lines and somatic embryos. In *Seeds: Genesis of Natural and Artificial Forms*, Amiens, France, Nov. 12-13, 1990, Le Biopole Végétal, Ed.: 123-133.
- TOWILL L.E., 1990 — Cryopreservation of shoot tips by vitrification. In *Abstr. VIIth Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Amsterdam: 379.
- URAGAMI A., SAKAI A., NAGAI M. et TAKAHASHI T., 1989 — Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep.*, **8**: 418-421.
- URAGAMI A., SAKAI A. et NAGAI M., 1990 — Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Rep.*, **9**: 328-331.
- WILKINS C.P., NEWBURY H.J. et DODDS J.H., 1989 — Tissue culture conservation of fruit trees. *FAO/IBPGR Plant Genet. Newslett.*, **73/74**: 9-20.
- WITHERS L.A., 1985a — Long term storage of *in vitro* cultures. In *In vitro Techniques, Propagation and Long Term Storage*. Schäfer-Menuhr(ed), Martinus Nijhoff: 137-148.
- WITHERS L.A., 1985b — Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, Kartha K.K.(ed), Boca Raton, CRC Press: 243-267.