

# L'UTILISATION DU FROID POUR LA CONSERVATION A LONG TERME DES ORGANES VEGETAUX

Daniel COME\*, Florent ENGELMANN\*\*

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : **B\* 6922** Ex : **1**

**RÉSUMÉ :** Différentes techniques sont recherchées pour assurer une conservation à long terme des semences et des organes produits par la culture in vitro. La conservation des semences orthodoxes ne pose généralement pas de problème important. Il suffit souvent de les déshydrater suffisamment et de les maintenir à une température aussi basse que possible. La lyophilisation pourrait être aussi une méthode intéressante. Au contraire, les semences récalcitrantes sont très difficiles à conserver, à cause de leur sensibilité à la dessiccation et à l'abaissement de la température. Le seul moyen actuel qui soit réellement efficace pour la conservation prolongée des organes produits in vitro est la cryoconservation, c'est-à-dire leur maintien à une très basse température (généralement celle de l'azote liquide). Cependant, la mise en œuvre d'un tel procédé nécessite une longue mise au point qui dépend de l'espèce et de l'organe considérés. Cette méthode est peut-être aussi envisageable pour certaines semences récalcitrantes.

**SUMMARY :** Various techniques are investigated for long-term storage of seeds and organs produced by in vitro culture. Storage of orthodox seeds is usually easy. They must be sufficiently dehydrated and maintained at a temperature as low as possible. Freeze-drying seems also to be an interesting method. On the contrary, recalcitrant seeds are very difficult to store, since they are very sensitive to dehydration and to chilling. The only current method which is really effective for long-term storage of organs produced in vitro is cryopreservation, i.e. storage at very low temperature (usually in liquid nitrogen). However, the use of this process requires a long restatement depending on the species and the organ. This method could also be viewed for some recalcitrant seeds.

## INTRODUCTION

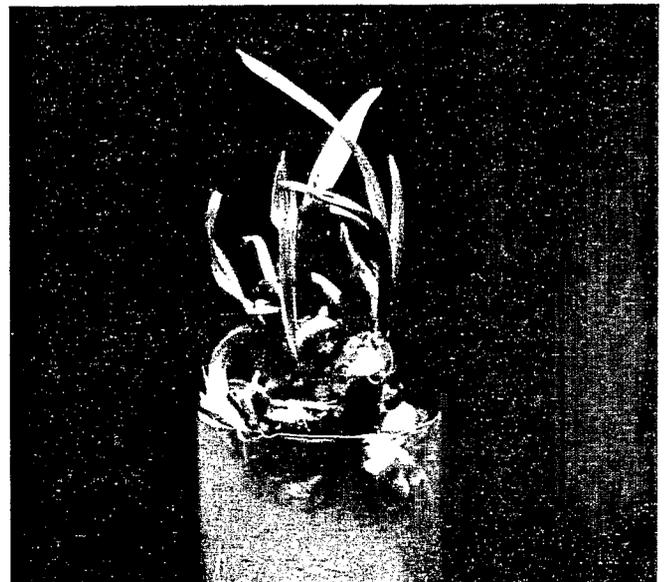
La conservation à long terme des organes végétaux capables de reproduire une plante apparaît de plus en plus comme une nécessité absolue, en particulier pour assurer le maintien du potentiel génétique des espèces et pour la mise en place de banques de gènes. Des efforts importants ont été faits, depuis de nombreuses années, pour permettre une survie prolongée des semences des multiples obtentions végétales, souvent hautement sélectionnées, mais aussi des espèces sauvages qui constituent de véritables réserves de gènes utilisables en amélioration des plantes. Plus récemment, le développement des techniques de la culture in vitro a également conduit à la recherche de méthodes efficaces de conservation des organes produits de cette façon.

Fonds Documentaire ORSTOM



010006922

\* Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Physiologie Végétale Appliquée, tour 53, 1er étage, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05.  
\*\* Chargé de Recherches à l'ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex.



Pousses feuillées issues de matériel cryoconservé

## 1. LE CAS DES SEMENCES

Les semences sont, par excellence, les organes de propagation et de survie des végétaux supérieurs. Toutefois, si beaucoup d'entre elles restent viables très longtemps dans les conditions ordinaires, d'autres meurent rapidement. Ce sont ces dernières qui posent de réels problèmes de conservation.

### 1.1. La longévité des semences

Ewart (1) a classé les semences en trois catégories selon leur durée de survie dans les conditions naturelles : les semences macrobiotiques, mésobiotiques et microbiotiques.

— **Les semences macrobiotiques** survivent plus de 15 ans. Ce sont surtout des semences dites « dures », dont les téguments sont imperméables à l'eau. Leur longévité atteint souvent 50 à 100 ans (2). Becquerel (3, 4) a obtenu la germination de semences très anciennes provenant des collections du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Les semences de lotus (*Nelumbo nucifera*) sont bien connues pour leur longévité de plusieurs centaines d'années (5). Ødum (6) a pu faire germer des semences de *Chenopodium album* et de *Spergula arvensis* qui étaient âgées d'environ 1 700 ans. Mais le record est actuellement détenu par les graines de *Lupinus arcticus* qui germent encore après plus de 10 000 ans (7).

— **Les semences mésobiotiques** restent viables pendant trois à cinq ans. Ce sont les plus fréquentes.

— **Les semences microbiotiques** meurent en moins de trois ans. Il en existe de nombreux exemples (2). Certaines ne survivent que quelques semaines ou même quelques jours. Les semences riches en réserves lipidiques et, surtout, celles qui ne supportent pas la dessiccation (semences dites « récalcitrantes ») entrent dans cette catégorie.

### 1.2. Semences orthodoxes et semences récalcitrantes

Les semences ont été qualifiées d'orthodoxes ou de récalcitrantes par Roberts (8) selon qu'elles supportent ou non la dessiccation. Les semences orthodoxes subissent une forte déshydratation au cours de leur maturation et survivent parfaitement dans cet état ; ce sont les plus nombreuses. Les semences récalcitrantes restent, au contraire, très aqueuses et meurent rapidement quand elles perdent de l'eau. Elles se rencontrent chez quelques espèces arborescentes des climats tempérés (chêne, châtaignier, noyer, marronnier, saule), mais elles sont surtout caractéristiques de certains arbres tropicaux ou subtropicaux.

A maturité, les semences orthodoxes ont généralement une teneur en eau de l'ordre de 10 à 15 % par rapport à la matière sèche. Elles supportent même une déshydratation plus poussée ; cette propriété est d'ailleurs mise à profit pour prolonger leur viabilité. Leur germination exige évidemment un apport d'eau ; elle est aussi étroitement dépendante des facteurs du milieu (principalement la température) et se trouve souvent sous le contrôle de multiples systèmes régulateurs qui constituent les dormances.

Au contraire, les semences récalcitrantes sont très sensibles à la dessiccation. La teneur en eau au-dessous de laquelle elles meurent est généralement comprise entre 20 et 50 % par rapport à la matière sèche (tableau I). Leur germination doit donc se produire dès qu'elles tombent sur le sol, sinon elles ne survivent pas. De plus, elles ne présentent aucune dormance bien marquée et sont naturellement suffisamment hydratées pour qu'elles germent sans apport d'eau supplémentaire. Elles sont même souvent capables de germer sur l'arbre ou dans le fruit où elles se trouvent enfermées. Leur biologie et la physiologie de leur germination sont beaucoup moins bien connues que dans le cas des semences orthodoxes.

### 1.3. Conservation des semences orthodoxes

La température de conservation et la teneur en eau des semences orthodoxes sont les principaux facteurs de leur longévité (9, 10, 11, 12). D'une façon générale, plus elles sont déshydratées et plus la température est basse, plus leur viabilité est prolongée. D'après les travaux de Roberts et Ellis (13), leur durée de vie est doublée chaque fois que leur teneur en eau est diminuée de 2,5 % ou que la température est abaissée de 6 °C. Pour assurer une conservation très prolongée de ces semences, il est donc conseillé de les maintenir au froid et dans un état de déshydratation aussi poussé que possible. De très basses températures (— 20 °C au moins) sont souvent très favorables à leur survie. Le Bureau International des Ressources Génétiques recommande d'amener leur teneur en eau à  $5 \pm 1$  % (par rapport à la matière fraîche) et de les placer dans des récipients hermétiquement clos, à une température ne dépassant pas — 18 °C (13). Des résultats récents permettent d'espérer une conservation de très longue durée dans l'azote liquide ou par lyophilisation. De telles méthodes pourraient présenter un grand intérêt pour des résultats obtenus après quatre ans et huit ans avec les semences de quelques espèces cultivées pour lesquelles la conservation par lyophilisation semble très intéressante. Cette technique a, de plus, le grand avantage de ne nécessiter aucun local particulier, à condition que les semences soient maintenues sous vide.

### 1.4. Conservation des semences récalcitrantes

Du fait qu'elles ne supportent pas une dessiccation importante, les semences récalcitrantes ne peuvent être conservées qu'à l'état hydraté. Mais elles risquent de germer car elles ne présentent pas de dormance. Il est donc nécessaire de les maintenir humides tout en empêchant ou en limitant leur germination. L'emploi du froid ne permet généralement pas de résoudre ce problème. En effet, les semences récalcitrantes étant, le plus souvent, d'origine tropicale, elles ne survivent pas quand elles sont placées à des températures trop basses. Elles sont sensibles au gel puisqu'elles sont riches en eau, mais elles ne tolèrent pas, non plus, des températures fraîches (inférieures, en général, à + 12 °C ou + 15 °C) qui occasionnent des « maladies du froid ».

Lorsqu'elles sont conservées au sec, les semences récalcitrantes meurent rapidement parce qu'elles se dessèchent (figure 1). Cependant, pour les semences de quelques espèces vivant en climats tempérés, qui

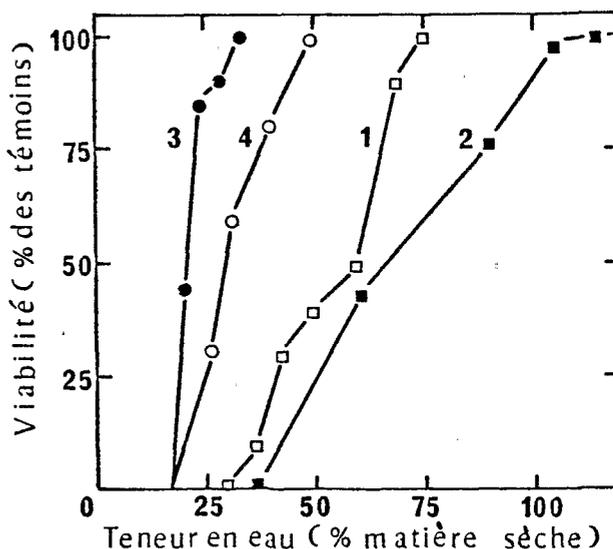


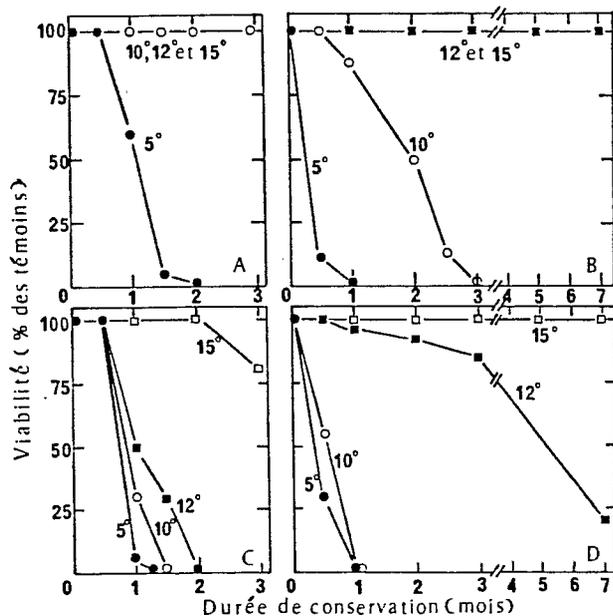
Figure 1 : Relation entre la teneur en eau (en % par rapport à la matière sèche) et la viabilité (en % par rapport aux semences témoins fraîchement récoltées) des semences récalcitrantes de 4 espèces tropicales conservées au sec, à 20 °C. 1, *Mangifera indica* ; 2, *Symphonia globulifera* ; 3, *Shorea roxburghii* ; 4, *Hopea odorata*. Au moment de la récolte, toutes les semences étaient parfaitement viables. D'après Corbinau et Côme (14).

**Tableau 1**  
Exemples de semences récalcitrantes et teneur moyenne en eau au-dessous de laquelle elles meurent

Espèces	Teneur minimale en eau (% matière sèche)
Acer platanoides	30 à 35
Acer saccharinum	30 à 34
Citrus grandis	52
Citrus sinensis	25
Hevea brasiliensis	25 à 30
Hopea odorata	20 à 25
Mangifera indica	30 à 35
Quercus alba	25
Quercus sessiliflora	30 à 40
Shorea roxburghii	25 à 30
Symphonia globulifera	40 à 45
Theobroma cacao	45 à 50

sont réputées très sensibles à la dessiccation, il est possible de prolonger leur viabilité en les déshydratant partiellement et en les plaçant au voisinage de 0 °C. Parmi ces espèces, on peut citer le chêne, le hêtre, le châtaignier, le noyer, le saule et le peuplier (15, 16, 17, 18).

Les semences tropicales récalcitrantes maintenues en milieu humide sont trop sensibles au froid pour qu'une conservation de longue durée puisse être envisagée. Ainsi, dans les exemples de la figure 2, une forte mortalité apparaît rapidement quand la température est inférieure à 10 °C pour *Shorea roxburghii*, 12 °C pour *Mangifera indica* (manguier), 15 °C pour *Symphonia globulifera* et environ 20 °C pour *Hopea odorata*. Aux températures qui n'entraînent pas de maladie du froid, la conservation ne peut pas dépasser quelques mois parce que la germination est trop rapide. Pour de telles semences, il n'existe actuellement aucune méthode satisfaisante de conservation à long terme.



**Figure 2 :** Évolution au cours de la conservation en milieu humide, à 5°, 10°, 12° et 15°C, de la viabilité (en % par rapport aux semences témoins fraîchement récoltées) des semences récalcitrantes de 4 espèces tropicales. A, *Shorea roxburghii* ; B, *Mangifera indica* ; C, *Hopea odorata* ; D, *Symphonia globulifera*. Au moment de la récolte, toutes les semences étaient parfaitement viables. D'après Corbiveau et Côme (14).



**Vitro plant, provenant de matériel cryoconservé en cours d'acclimatation en serre.**

## 2. LE CAS DES ORGANES PRODUITS IN VITRO

Les techniques de la culture in vitro se sont beaucoup développées en vue de la production en masse de jeunes plants ou d'embryons somatiques, du maintien de souches ayant des caractéristiques particulières, etc. Actuellement, la seule méthode susceptible d'assurer une très longue conservation du matériel végétal produit grâce à ces techniques est la cryoconservation, c'est-à-dire le stockage à une très basse température (généralement celle de l'azote liquide). Dans ces conditions, en effet, les divisions cellulaires sont arrêtées et tous les processus métaboliques sont totalement bloqués sans être alertés, ce qui permet une conservation pendant une durée théoriquement infinie (19).

### 2.1. Principe de la cryoconservation

Aucun organe hydraté ne peut survivre à une température aussi basse que celle de l'azote liquide (− 196 °C) sans y avoir été « préparé ». De plus, à l'issue de la conservation, il faut pouvoir le réchauffer sans qu'il subisse de dommage. Enfin, il est nécessaire qu'il reprenne une activité organogénétique normale après avoir été réchauffé. La cryoconservation comprend donc toute une série d'étapes que l'on peut résumer de la façon suivante :

— **Prétraitement** : Il s'agit de la préparation des organes à supporter les très basses températures. Celles-ci consiste schématiquement en une déshydratation partielle des cellules et en l'emploi obligatoire de substances cryoprotectrices dont la nature peut être très variable ; ce traitement est complété, dans certains cas, par un endurcissement au gel par séjour plus ou moins prolongé des cultures à une température froide mais positive.

— **Congélation** : Elle est parfois réalisée par trempage direct des ampoules contenant les échantillons dans l'azote liquide, mais, le plus souvent, elle est effectuée en deux étapes : refroidissement programmé jusqu'à une température généralement comprise entre − 40 °C et − 100 °C, puis immersion dans l'azote liquide.

— **Conservation** : Elle est assurée par maintien des ampoules dans l'azote liquide et ne présente aucune difficulté particulière.

— **Réchauffement** : Dans la plupart des cas, il doit être très rapide pour éviter que les microcristaux de glace formés lors de la congélation fusionnent et atteignent une taille dommageable pour l'intégrité des cellules. Il se fait généralement par transfert direct des ampoules de l'azote liquide dans un bain-marie à environ 40 °C.

— **Post-traitement** : C'est la remise en culture in vitro du matériel réchauffé, dans des conditions adaptées à la reprise de sa croissance.

## 2.2. Un exemple : les embryons somatiques de palmier à huile

La cryoconservation n'est pas toujours simple à mettre en œuvre, chaque cas devant faire l'objet d'une longue étude destinée à déterminer, pour chacune des étapes, les conditions les mieux adaptées. Elle a été réalisée expérimentalement avec plus de 70 espèces végétales, sous des formes diverses : suspensions cellulaires, cals, méristèmes, embryons somatiques, polliniques ou zygotiques (20). Toutefois, le passage de la mise au point d'une méthode de cryoconservation à son utilisation dans le procédé de multiplication *in vitro* d'une espèce donnée reste encore exceptionnel. Il est en cours de réalisation dans le cas du palmier à huile (21, 22, 23).

Dès 1970, l'IRHO (Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux) s'est associé à l'ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) pour la recherche d'une méthode de multiplication végétative du palmier à huile par culture *in vitro*. En effet, les techniques classiques (bouturage, greffage ou marcottage) ne

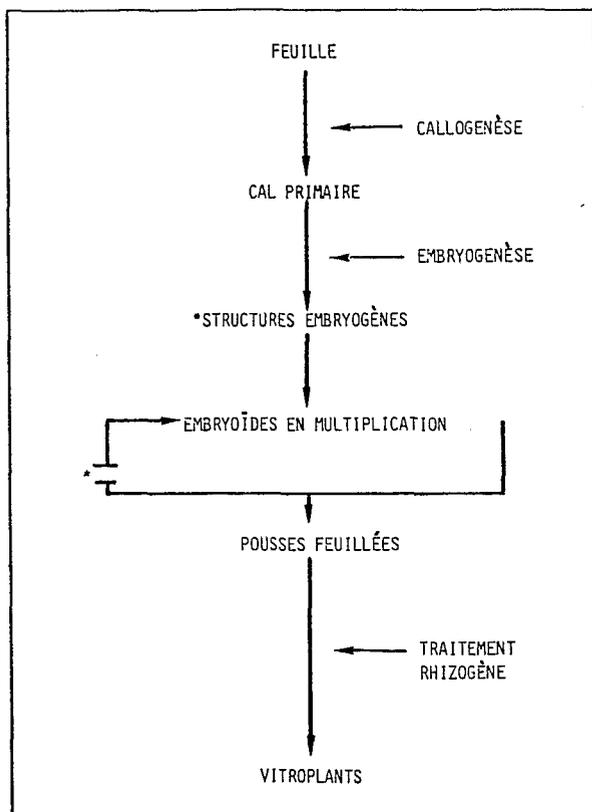


Figure 3 : Schéma du procédé de multiplication *in vitro* du palmier à huile. Les niveaux d'application de la cryoconservation sont indiqués par des astérisques.

sont pas applicables à cette plante dont seul le bourgeon terminal est végétatif.

La méthode de multiplication *in vitro* qui a été mise au point, résumée dans la figure 3, utilise l'embryogénèse somatique à partir de cals foliaires (24, 25). Les plants sont produits à grande échelle grâce au développement d'embryons adventifs sur les embryons somatiques. Cette embryogénèse se poursuit, dans certains cas, de manière continue et permet le maintien en culture *in vitro* de lignées d'embryoïdes pendant plusieurs années.

Du fait de l'industrialisation du procédé, il a été envisagé de mettre au point une méthode de cryoconservation des embryons somatiques pour faire face à deux problèmes de nature différente : 1) la gestion des laboratoires, car l'apport constant de matériel végétal implique une augmentation des surfaces des salles de culture et les repiquages réguliers nécessaires à l'entretien des clones d'embryoïdes entraînent des coûts élevés en main-d'œuvre et en équipement ; 2) le maintien de la conformité du matériel régénéré qui exige de diminuer le plus possible la durée de la

multiplication *in vitro*, à cause des risques d'apparition d'anomalies liées à l'emploi de régulateurs de croissance.

La méthode de cryoconservation qui a été mise au point (21, 22) a été appliquée aux embryons en multiplication et aux structures embryogènes (figure 3). Elle comporte les étapes suivantes qui sont schématisées dans la figure 4 :

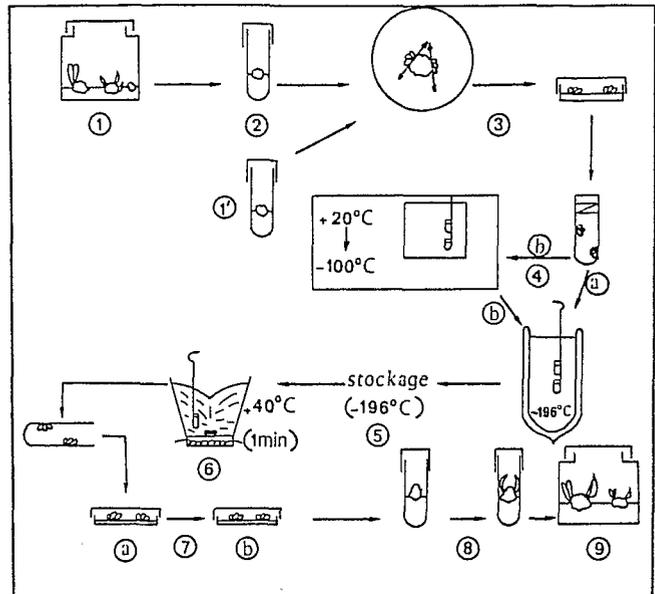


Figure 4 : Schéma général du procédé de cryoconservation des embryoides de palmier à huile. 1 et 1', matériel de départ : 1, embryoides en multiplication ; 1', structures embryogènes ; 2, obtention de massifs d'embryoïdes pour la congélation (culture de 2 mois sur un milieu contenant du saccharose 0,3M) ; 3, dissection des massifs d'embryoïdes et prétraitement de 7 jours sur un milieu contenant du saccharose 0,75M ; 4, refroidissement : a, rapide ; b, programmé ; 5, stockage dans l'azote liquide ; 6, réchauffement (1 min à + 40 °C) ; 7, post-traitement : a, 1 semaine en présence de saccharose 0,3M et de 2,4-D  $10^{-6}$ M (embryoïdes en multiplication) ; b, 2 semaines en présence de saccharose 0,1M et de 2,4-D  $10^{-6}$ M (embryoïdes en multiplication) ; 8, repiquages successifs sur le milieu de multiplication pour la reprise de la prolifération ; 9, repiquage en bocal pour l'extension des cultures et la production de pousses feuillées.

— **Obtention de jeunes embryoides**, seuls capables de résister à la congélation. Ces embryoides sont produits avec une fréquence élevée après une culture de deux mois sur un milieu enrichi en saccharose (23).

— **Prétraitement** : Les massifs d'embryoïdes sont placés pendant 7 jours sur un milieu fortement enrichi en saccharose, ce qui a pour effet de diminuer leur teneur en eau.

— **Congélation et conservation** : Les massifs d'embryoïdes, placés dans des cryotubes stériles de 2 ml, sont congelés rapidement ( $200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), par immersion directe dans l'azote liquide, ou en deux étapes comprenant un refroidissement contrôlé de + 20 °C à - 100 °C, réalisé au moyen d'un congélateur programmable (type Minicool, commercialisé par l'Air Liquide), suivi d'une immersion puis d'un stockage dans l'azote liquide (les vitesses de refroidissement varient alors de  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  à  $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ).

— **Réchauffement** : Les cryotubes sont plongés pendant une minute dans un bain-marie thermostaté à 40 °C.

— **Post-traitement** : Les massifs d'embryoïdes sont cultivés pendant trois semaines sur des milieux additionnés d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et progressivement appauvris en saccharose. Ils sont ensuite repiqués sur un milieu dépourvu d'auxine.

Des vitroplants, obtenus par culture de massifs d'embryoïdes traités de cette façon, ont été acclimatés en serre et se sont comportés normalement. Par ailleurs, des pousses feuillées de deux clones, l'un congelé au stade « embryoides en multiplication » et l'autre au stade « structures

embryogènes », ont été envoyées à la Station de Recherche IRHO/CIRAD de La Mé (Côte d'Ivoire). Elles ont été mises à enraciner, acclimatées en pré-pépinière, cultivées en pépinière puis plantées en champ. Leur enracinement et leur développement ont été identiques à ceux de vitroplants provenant d'embryoïdes témoins non congelés. Les observations sont actuellement poursuivies pour vérifier, en particulier au niveau de la floraison, la conformité des plantes adultes.

La cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile fait actuellement l'objet d'un transfert de technologie. Le procédé est en cours d'application dans les laboratoires de Côte d'Ivoire, de Malaisie et d'Indonésie pour le stockage des clones qu'ils produisent. La même technique va également être prochainement étendue à la conservation des embryons zygotiques de palmier à huile et de cocotier, dont l'équipe ORSTOM/IRHO maîtrise la culture *in vitro* (26, 27).

**Tableau 2**

**Pourcentages de germination obtenus à 20 °C avec les semences orthodoxes de quelques espèces cultivées, au moment de la récolte et après 4 ans et 8 ans de conservation à la température ambiante.**

**T, semence témoins placées à l'air libre ;**

**L, semences lyophilisées conservées sous vide. D'après Côme.**

Espèces	Germination (%) après					
	0 (récolte)		4 ans		8 ans	
	T	L	T	L	T	L
Asperge	93	96	0	62	0	60
Chicorée	96	90	4	100	0	68
Fenouil	100	83	4	72	0	50
Mâche	88	96	4	100	0	80
Oignon	92	92	8	72	2	74

## CONCLUSION

La conservation à long terme des organes végétaux est un sujet d'actualité qu'il faut aborder de toutes les façons possibles. Le froid rend d'importants services dans le cas des semences orthodoxes. En revanche, de grandes difficultés sont rencontrées avec les semences récalcitrantes, à cause de leur biologie très particulière et, sans doute aussi, parce qu'elles ont fait l'objet de trop peu d'études. Les recherches sur la cryoconservation permettront peut-être de résoudre partiellement les problèmes posés par ces semences dont la biologie semble se rapprocher beaucoup plus de celle des organes produits *in vitro* que de celle des semences orthodoxes.

La lyophilisation paraît être aussi une technique intéressante pour la conservation très prolongée de certaines semences orthodoxes. Il n'est pas impossible qu'elle puisse être appliquée à des embryons somatiques ou à des méristèmes. Des recherches sont d'ailleurs engagées dans cette direction en ce qui concerne les semences artificielles que l'on essaie actuellement de fabriquer.

## BIBLIOGRAPHIE

(1) - Ewart A.J. - 1908 - On the longevity of seeds. Proc. Roy. Soc. Victoria, 21, 1-210.  
 (2) - Harrington J.F. - 1972 - Seed storage and longevity. Dans : Seed biology. Vol. III. Kozłowski T.T., éd., Academic Press, New York et Londres, 145-245.  
 (3) - Becquerel P. - 1907 - Recherches sur la vie latente des graines. Ann. Sci. Nat. Bot., 9, 193-311.  
 (4) - Becquerel P. - 1934 - La longévité des graines macrobiotiques, C.R. Acad. Sc. Paris, 199, 1662-1664.

(5) - Ohga I. - 1923 - On the longevity of the fruit of *Nelumbo nucifera*. Bot. Mag. (Tokyo), 37, 87-95.  
 (6) - Ødum S. - 1965 - Germination of ancient seeds. Floristical observations and experiments with archaeologically dated soil samples. Dansk Bot. Arkiv., 24, 1-70  
 (7) - Posild A.E., Harrington C.R., Mulligan G.A. - 1967 - *Lupinus arcticus* Wats. growth from seeds of the pleistocene age. Science, 158, 113-114.  
 (8) - Roberts E.H. - 1973 - Predicting the storage life of seeds. Seed Sci. & Technol., 1, 499-514.  
 (9) - Barton L.V. - 1961 - Seed preservation and longevity. Leonard Hill, New York.  
 (10) - James E. - 1967 - Preservation of seed stocks. Adv. Agron., 19, 87-106.  
 (11) - Roberts E.H. - 1972 - Storage environment and the control of viability. Dans : Viability of seeds. Roberts E.H., éd., Chapman and Hall, Londres, 14-58.  
 (12) - Harrington J.F. - 1973 - Problems of seed storage. Dans : Seed ecology. Heydecker W., éd., Butterworths, Londres, 251-263.  
 (13) - Roberts E.H., Ellis R.H. - 1977 - Predicting of seed longevity at sub-zero temperatures and genetic resources conservation. Nature, 268, 431-432.  
 (14) - Corbineau F., Côme D. - 1988 - Storage of recalcitrant seeds of four tropical species. Seed Sci. & Technol., 16, 97-103.  
 (15) - Crocker W. - 1938 - Life span in seeds. Bot. Rev., 4, 235-274.  
 (16) - Suszka B. - 1974 - Storage of beech (*Fagus silvatica* L.) seed for up to 5 winters. Arboretum Kornickie, 19, 105-128.  
 (17) - Suszka B. - 1975 - Cold storage of already after-ripened beech (*Fagus silvatica* L.) seeds. Arboretum Kornickie, 20, 299-315.  
 (18) - Bonnet-Masimbert M., Muller C. - 1975 - La conservation des graines est possible. Rev. For. Fr., 27, 129-138.  
 (19) - Kartha K.K. - 1981 - Genepool conservation through tissue culture. Proc. Costed Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants. RAO A.N., éd., Singapour, 213-218.  
 (20) - Dereuddre J., Engelmann F. - 1987 - The use of cryopreservation for setting up banks of plant germplasm. Proc. Coll. Franco-Britannique IAPTC, Angers, 48-78.  
 (21) - Engelmann F., Duval Y., 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. Sc. Paris, 301, série III, 111-116.  
 (22) - Engelmann F., Duval Y., - 1986 - Cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) : Résultats et perspectives d'application. Oléagineux, 41, 169-174.  
 (23) - Engelmann F., Duval Y., Pannetier C. - 1988 - Utilisation des techniques de cryoconservation pour la création de banques d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Oléagineux, 43, 323-328.  
 (24) - Pannetier C., Arthuis P., Lievoux D. - 1981 - Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis Guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. Oléagineux, 36, 119-122.  
 (25) - Hanover J., Pannetier C. - 1982 - *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. Proc. 5th Int. Congr. Plant. Tissue and Cell Culture. Fujiwara A., éd., Tokyo, 745-746.  
 (26) - Rabechault H., Cas S. - 1974 - Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). Oléagineux, 29, 73-78.  
 (27) - Assy-Bah B. - 1986 - Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotier. Oléagineux, 41, 321-328.