

La cryoconservation des embryons somatiques, polliniques et zygotiques

par Florent ENGELMANN et Catherine BAUBAULT (*)

*Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux après Récolte
C.N.R.S., 4ter route des Cardes, 92190 Meudon, France*

Résumé.— La cryoconservation des embryons d'espèces végétales peut être utilisée pour la conservation d'embryons d'espèces à semences récalcitrantes, d'embryons somatiques, d'embryons issus de croisements incompatibles et de matériel haploïde, embryons polliniques ou anthères.

Les données bibliographiques présentées font ressortir la très grande hétérogénéité des processus de cryoconservation mis au point : nature et concentration des substances cryoprotectrices, mode et vitesse de congélation, réponse du matériel. Cette diversité est illustrée par la présentation des résultats obtenus pour la cryoconservation de deux matériels différents : les embryons somatiques de palmier à huile et les embryons zygotiques de colza.

Pour la congélation des embryons somatiques de palmier à huile, le saccharose est employé comme agent cryoprotecteur. La vitesse de refroidissement peut varier de 0,5 à 200°C min.⁻¹ sans répercussion sur la survie des embryons. Des différences n'apparaissent que lors de la reprise de l'embryogenèse adventive des deux clones étudiés. Pour leur congélation, les embryons zygotiques de colza sont placés 24 heures en milieu liquide fortement concentré en saccharose avant l'adjonction de DMSO (5 à 10 %). Seule la congélation rapide en paillettes permet d'obtenir leur survie et leur développement en plantes normales.

La comparaison des résultats obtenus sur ces deux matériels avec les données bibliographiques présentées permet de dégager sept points principaux qui peuvent conditionner la réussite de la cryoconservation d'embryons d'une espèce donnée. Ce sont : l'espèce et le génotype, la taille et le stade de développement des embryons, la teneur en eau et la déshydratation, la nature et la concentration des agents cryoprotecteurs, le mode et la vitesse de congélation, le réchauffement, le post-traitement.

Summary.— Cryopreservation of plant embryos can be used for the conservation of embryos of recalcitrant species, somatic embryos, hybrid embryos which abort at early developmental stages and haploid material, pollinic embryos or anthers.

Scientific data presented emphasize the large heterogeneity of cryopreservation processes concerning the nature and concentration of cryoprotectants, the method and rate of freezing, the response of frozen material. This diversity is illustrated by the presentation of results concerning the cryopreservation of two different materials : somatic embryos of oil palm and zygotic embryos of oil seed rape. In order to freeze somatic embryos of oil palm, sucrose is employed as cryoprotectant. The freezing rate can vary from 0.5 to 200°C min.⁻¹ without consequences on the survival of embryos. Differences between the two clones studied appear only during the recovery of adventive embryogenesis. For their cryopreservation, the zygotic embryos of oil seed rape are placed during 24 hours in a liquid medium enriched with sucrose before the adding of 5 to 10 % of DMSO. Only rapid freezing in straws ensures their survival and their development into normal plants.

Comparison of results concerning these two materials with scientific data presented allows to bring out seven important points which can condition the successful cryopreservation of embryos of

(*) adresse actuelle : C.N.I.H., Station Ile de France, Domaine de la Jonction, 78240 Cham-bourcy, France.

a given species : species and genotype, size and stage of development, water content and dehydration, nature and concentration of cryoprotectants, method and rate of freezing, thawing and post-treatment.

*
* *

INTRODUCTION

La cryoconservation des embryons d'espèces végétales qui est un domaine de recherches encore peu développé en comparaison des nombreux travaux réalisés sur les embryons d'espèces animales, ouvre néanmoins un large champ d'applications (Bajaj, 1985).

Pour de nombreuses espèces végétales, les graines, dites orthodoxes, représentent le moyen de stockage habituel. Par contre, les semences, dites récalcitrantes, d'autres espèces ne supportent ni la déshydratation, ni l'abaissement de température généralement utilisés dans les techniques de conservation. Parmi ces espèces dont les graines ont une durée de vie qui ne peut excéder quelques mois, on trouve des représentants de groupes très divers (fruitiers, plantes stimulantes, plantes à huiles végétales, épices, plantes forestières, horticoles, médicinales, etc.) dont beaucoup ont une grande importance économique (Roberts et King, 1980). La conservation de ce matériel peut être envisagée, non plus sous forme de graine entière, mais d'embryon excisé, à condition que la technique de culture *in vitro* de l'embryon soit déjà au point pour l'espèce considérée.

Certaines espèces (caféier, palmier à huile) sont multipliées *in vitro* par embryogénèse somatique. Le stockage dans l'azote liquide de ces embryons somatiques peut être envisagé comme substitut de conservation de la graine. Ces embryons pourraient d'ailleurs être stockés sous forme de graines synthétiques, c'est-à-dire encapsulés dans des résines hydro-solubles après déshydratation partielle (Ammirato, 1984 ; Kitto et Janick, 1985a, b, c.).

Dans le cas de croisements incompatibles qui provoquent un avortement assez rapide des embryons, il est possible d'éviter ceci en excisant très tôt les embryons pour les cryoconserver, puis les cultiver *in vitro* après leur décongélation.

Enfin, il apparaît intéressant de conserver du matériel haploïde, généralement instable en culture *in vitro* (Kasha et coll., 1982) sous forme d'embryons polliniques, nucellaires ou d'anthères entières.

Le tableau 1 récapitule les principaux travaux effectués concernant la congélation dans l'azote liquide d'embryons somatiques, polliniques, nucellaires et zygotiques d'espèces végétales. Il nous indique que la résistance à la température de l'azote liquide a été obtenue pour des espèces et des matériels très divers et dans des conditions souvent très différentes. Les substances cryoprotectrices les plus couramment employées sont le DMSO, le saccharose et le glycérol. Elles sont utilisées, suivant leur toxicité, en quantité de l'ordre de 5 à 15 % (v/v) et sont employées seules ou en mélange (DMSO + saccharose, DMSO + saccharose + glycérol). Les échantillons peuvent subir des congélations ultra-rapides (quelques 10^3 °C min.⁻¹), rapides (100 à 200 °C min.⁻¹) ou lentes (0,1 à quelques °C min.⁻¹). De même, la réponse obtenue après décongélation peut aller de la callogénèse (coton, pétunia) à la régénération de plantes entières (carotte, tabac, primevère, palmier à huile, etc.). Les conditions des différentes phases présentées dans ce tableau (substances cryoprotectrices, vitesse de congélation, réponse du matériel) seront discutées en conclusion, en les comparant avec les résultats obtenus lors d'essais de cryoconservation de

2 matériels différents :

- les embryons somatiques de palmier à huile
- les embryons zygotiques de colza

Le palmier à huile est la plante dont le rendement en huile est le plus élevé parmi les plantes oléagineuses. Son importance économique est grande puisque la production d'huile de palme en 1984 représentait 15 % de l'huile d'origine végétale (Noiret et coll., 1985). Cette plante étant allogamme à reproduction strictement sexuée et ne possédant qu'un seul bourgeon végétatif, l'apex, il était intéressant de mettre au point une technique de multiplication végétative *in vitro* des individus sélectionnés pour leurs caractères exceptionnels.

Ceci a été réalisé par plusieurs équipes, à partir d'explants racinaires (Corley et coll., 1976) ou foliaires (Rabéchault et Martin, 1976). Le procédé mis au point par l'équipe ORSTOM/IRHO de Bondy (Pannetier et coll., 1981) est basé sur la multiplication d'embryons somatiques par embryogenèse adventive ; il est maintenant utilisé à l'échelle industrielle. Les risques présentés pour la stabilité des cultures par le maintien en culture *in vitro* de lignées d'embryons pendant plusieurs années (Bayliss, 1980 ; Reisch, 1984) ont conduit à la mise au point d'une méthode de congélation des embryons utilisant une vitesse de refroidissement rapide ($200^{\circ}\text{C min}^{-1}$) (Engelmann et coll., 1985). Les résultats présentés ici concernent une amélioration de la technique existante par l'emploi de vitesses de congélation faibles réalisées au moyen d'un congélateur programmable.

Le colza est amené à prendre une place considérable dans la production française en protéagineux. Parmi tournesol, pois, fève et colza, cette dernière plante est la seule à pouvoir rivaliser avec le soja américain. De nombreuses recherches ont mené à la production de nouvelles variétés (type double zéro) dépourvues d'acide érucique, résistantes au *Phoma* et à faible teneur en glucosynolates.

Une technique de cryoconservation d'embryons zygotiques de colza a déjà été mise au point (Withers, 1982b). Avec cette méthode, seule une callogenèse a été obtenue après passage des embryons dans l'azote liquide. Nous présentons ici une nouvelle technique permettant la survie des embryons zygotiques après leur congélation et leur évolution directe en plantules.

CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS SOMATIQUES DE PALMIER A HUILE

1/ Matériel et méthodes

• Culture des embryons

Les cultures d'embryons somatiques adventifs (Fig. 1) ont été produites par l'équipe ORSTOM/IRHO de Bondy selon une méthode décrite précédemment (Pannetier et coll., 1981). Elles proviennent de la mise en culture de fragments foliaires d'un arbre adulte (BC156) et d'un plant de pépinière (BC068). Ces cultures sont repiquées tous les mois sur un milieu de Murashige et Skoog modifié (Hanower et Pannetier, 1982) et dépourvu de régulateurs de croissance (milieu standard) contenant 0,1 M de saccharose. Les cultures sont placées à 27°C sous un éclairage de 20 W.m^{-2} (tubes fluorescents Duro-test type True Lite) avec une photopériode de 12 heures sur 24.

• Choix des embryons pour les expériences de congélation

Des essais préliminaires ont montré qu'une culture de 2 mois sur le milieu standard contenant 0,3 M de saccharose permet d'obtenir avec une fréquence élevée de jeunes embryons non chlorophylliens, d'une taille de 1 à 3 mm, seuls capables de supporter la

Matériel	Cryoprotecteur	Vitesse de congélation	Réponse	Auteurs
Embryons somatiques				
<i>Daucus carota</i>	5% - 10% DMSO	1 - 2°C min ⁻¹		Dougall et Wetherell, 1974
	10% DMSO + dessiccation	2°C min ⁻¹ , 5°C min ⁻¹ , 10°C min ⁻¹ , 65°C min ⁻¹	jusqu'à 80% de survie, pro-embryons, embryogenèse normale, cals ou plantes	Withers, 1979
Embryons polliniques (anthères)				
1 <i>Arachis hypogea</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C min ⁻¹ , rapide	29 - 38% de survie cals, pousses feuillées	Bajaj, 1983a
2 <i>Arachis villosa</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C min ⁻¹ , rapide	31 - 44% de survie cals, plantes	Bajaj, 1983a
3 <i>Atropa belladonna</i>	5% DMSO - 10% DMSO	2°C min ⁻¹	plantes entières haploïdes	Bajaj, 1976, 1977, 1978a
4 <i>Brassica campestris</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C min ⁻¹ , rapide	34% de survie de cals issus de pollen et d'anthères	Bajaj, 1983a
5 <i>Brassica napus</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C min ⁻¹ , rapide	androgenèse, plantes entières	Bajaj, 1983a
6 <i>Gossypium arboreum</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C min ⁻¹ , rapide	androgenèse, plantes entières	Bajaj, 1982
7 <i>Nicotiana tabacum</i>	5% DMSO - 10% DMSO	2°C min ⁻¹	androgenèse, plantes entières	Bajaj, 1977, 1978a et b
8 <i>Oryza sativa</i>	5% DMSO	1 à 3°C min ⁻¹	embryons, cals, plantes entières haploïdes	Coulibaly et Demarlv, 1979
9 <i>Oryza sativa</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	rapide	cals, plantes entières haploïdes	Bajaj, 1980a
10 <i>Petunia hybrida</i>	7% DMSO	2°C min ⁻¹	cals	Bajaj, 1978a
11 <i>Primula obconica</i>	7% DMSO + 7% saccharose	rapide	androgenèse, plantes entières	Bajaj, 1981a
12 <i>Triticum aestivum</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C min ⁻¹ , rapide	5 - 19% de survie, cals, pousses feuillées	Bajaj, 1983a
Embryons nucléaires (ovules)				
<i>Citrus</i>	7% DMSO + 4 % saccharose	ultra-rapide	pseudo-bulbilles et pousses feuillées	Bajaj, 1983b
Embryons zygotiques				
1 <i>Brassica napus</i>	10% DMSO	ultra-rapide, rapide	15% callogenèse extrémité racinaire	Withers, 1982
2 <i>Capsella bursa-pastoris</i>	30% saccharose	0,1°C min ⁻¹	70% survie	Monnier et Leddet, 1980
3 <i>Cocos nucifera</i>	7% DMSO + 4% saccharose	ultra-rapide	embryons : élongation, fragments d'embryons : prolifération	Bajaj, 1983c
4 <i>Elaeis guineensis</i>	dessiccation	ultra-rapide	plantes entières	Grout et coll., 1983
5 <i>Gossypium arboreum</i>	5% DMSO + 5% glycérol + 5% saccharose	65°C min ⁻¹ , rapide	42% callogenèse	Bajaj, 1982
6 <i>Hordeum vulgare</i>	10% DMSO	ultra-rapide, rapide, 1°C min ⁻¹	75-100% survie + plantes	Withers, 1982
7 <i>Oryza sativa</i>	0	ultra-rapide, rapide, 1°C min ⁻¹	83% cals/pousses feuillées	Bajaj, 1981b
8 <i>Triticale</i>	10% DMSO + 4% saccharose	ultra-rapide, rapide, 1°C min ⁻¹	73% cals/plantes entières	Bajaj, 1984
9 <i>Triticum aestivum</i>	10% DMSO + 4% saccharose	rapide	70 % cals/plantes entières	Bajaj, 1980b
10 <i>Zea mays</i>	5 - 15% DMSO	ultra-rapide	plantes entières	Withers, 1978

congélation (Fig. 2). Ce type d'embryons a été utilisé pour nos expériences.

● *Obtention de plantules*

Au sein des cultures, certains embryons se développent spontanément en pousses feuillées. Lorsque ces pousses ont atteint une certaine taille, elles subissent un traitement auxinique inducteur de la rhizogenèse (Hanower et Pannetier, 1982). Lorsque le développement du système racinaire est suffisant, les jeunes plants sont acclimatés en serre avant leur passage en pépinière puis en conditions naturelles.

● *Méthode de congélation*

Les massifs d'embryons isolés (Fig. 3) subissent un prétraitement de 7 jours en boîtes de Petri sur le milieu standard additionné de 0,75 M de saccharose. Ils sont ensuite congelés à sec dans des ampoules stériles en polypropylène selon deux méthodes différentes. Les ampoules peuvent être immergées directement dans l'azote liquide ; la température de -196°C est atteinte en 1 min. environ. Les ampoules peuvent être placées dans la chambre d'un congélateur programmable de type Minicool (marque C.F.P.O.) et refroidies à 0,5, 1, 5, 10, 20 ou $40^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de $+20^{\circ}\text{C}$ à -100°C . Après un palier de 10 min. à cette température, les ampoules sont plongées dans l'azote liquide. Après un séjour d'une heure dans l'azote liquide, les massifs sont réchauffés en immergeant les ampoules pendant 1 min. dans un bain-marie thermostaté à $+40^{\circ}\text{C}$. Les embryons subissent alors un post-traitement de 3 semaines en boîtes de Petri, comprenant un séjour d'une semaine sur le milieu standard additionné de 0,3 M de saccharose et de 2,4-D à la concentration de 10^{-6}M , puis de 2 semaines sur le milieu standard additionné de 0,1 M de saccharose et de la même quantité de 2,4-D. Les massifs vivants sont alors repiqués en tubes sur le milieu standard avec 0,1 M de saccharose et dépourvu de 2,4-D.

Les résultats sont exprimés par le taux de survie, c'est-à-dire le pourcentage d'embryons ayant présenté une croissance pendant le post-traitement. La reprise de l'embryogenèse adventive est considérée comme acquise lorsque la culture d'embryons issue d'un massif congelé présente un taux de multiplication comparable à celui obtenu à partir de massifs non congelés (Fig. 4 et 5).

2/ Résultats

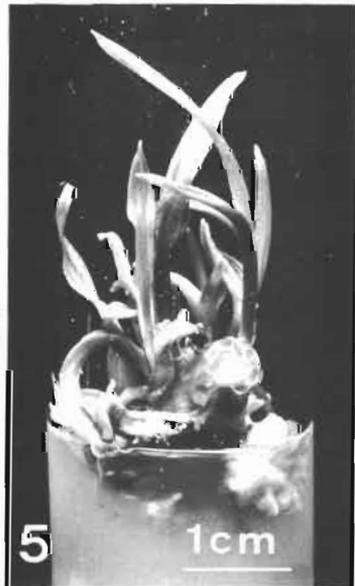
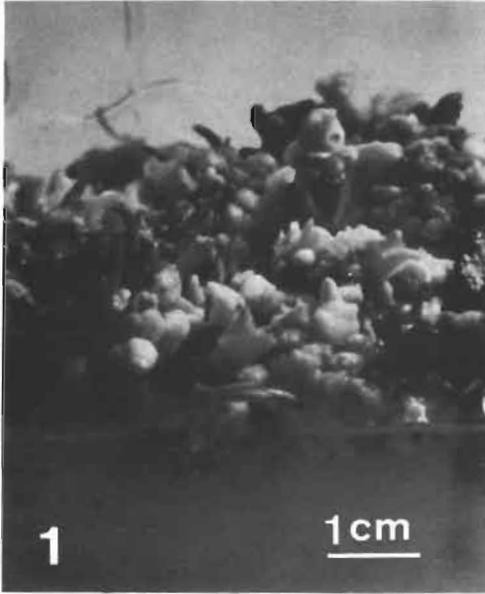
● *Choix de l'agent cryoprotecteur*

La substance cryoprotectrice utilisée est le saccharose à une concentration de 0,75 M. Des résultats non présentés dans cet article ont indiqué que 0,75 M correspondait à la concentration optimale. L'addition d'autres substances cryoprotectrices (DMSO) ou le remplacement d'une partie ou de la totalité du saccharose par du sorbitol n'ont pas donné de meilleurs résultats.

● *Influence de la vitesse de refroidissement sur le taux de survie et le taux de reprise des embryons congelés (Tableau 2)*

a/ Taux de survie.— Suivant les vitesses de refroidissement utilisées, les taux de survie varient de 58 à 81 % pour le clone BC068. On note pour le clone BC156 une différence plus nette entre les taux de survie obtenus pour des vitesses faibles ($0,5$ et $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$) et des vitesses de congélation plus élevées. Les taux de survie des 2 clones sont équivalents quelle que soit la vitesse de refroidissement utilisée (69,6 % en moyenne pour BC068, 67,2 % pour BC156).

Tableau 1.— Résumé des principaux travaux effectués sur la cryoconservation des embryons végétaux



Figures 1 à 5

Tableau 2.— Effet de la vitesse de congélation sur la survie des massifs d'embryons (observée 3 semaines après leur décongélation) et la reprise de leur prolifération (observée 3, 5 mois après décongélation). Comparaison du comportement des clones BC068 et BC156.

		Vitesse de congélation ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)						
		0,5	1	5	10	20	40	200
BC068	Nombre de massifs congelés	43	44	47	46	48	46	46
	Taux de survie (%)	58,1	65,9	74,5	63,0	81,2	65,2	80,4
	Taux de reprise de la prolifération (%)	9,3	11,4	19,1	10,9	22,9	13,0	15,2
BC156	Nombre de massifs congelés	48	48	48	48	48	48	48
	Taux de survie (%)	47,9	45,8	66,7	77,1	79,2	79,2	75
	Taux de reprise de la prolifération (%)	0	2,1	6,25	6,25	8,33	8,33	8,33

b/ Reprise de la prolifération.— Pour le clone BC068, on n'observe pas de différence significative du taux de reprise selon la vitesse de congélation utilisée. Pour le clone BC156, le taux de reprise est nul pour $0, 5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, très faible (2, 1 %) pour $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, puis il se stabilise pour les autres vitesses de refroidissement.

De plus, la reprise de la prolifération est beaucoup plus rapide et intense pour le clone BC068 que pour BC156, sans que l'on puisse dégager de vitesse de refroidissement optimale pour ces 2 paramètres.

Si l'on n'observe pas de différence entre les 2 clones étudiés en ce qui concerne le taux de survie, une différence apparaît lorsque l'on considère le taux de reprise de l'embryogenèse adventive chez les massifs congelés des 2 clones (14, 6 % en moyenne pour BC068 et 5, 6 % pour BC156).

La différence de comportement des 2 clones étudiés se traduit donc par un écart plus ou moins important entre le taux de survie, équivalent dans les 2 cas quelle que soit la vitesse de refroidissement, et le taux de reprise des massifs congelés, plus faible pour BC156 que pour BC068. Enfin, la reprise de la prolifération est plus rapide et intense pour le clone BC068 que pour le clone BC156.

CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS ZYGOTIQUES DE COLZA

1/ Matériel et méthode

• Matériel végétal

Les plantes de colza de printemps (*Brassica napus* L. cv. Tower) ont été cultivées en super-serres au Phytotron de Gif-sur-Yvette sous des conditions de température alternées : 22°C le jour, 12°C la nuit. Elles sont soumises à une photopériode de 16 heures en éclairage naturel avec une lumière d'appoint de 20 à 25 W.m^{-2} .

Figures 1 à 5

Fig. 1.— Culture d'embryons somatiques de palmier à huile sur milieu standard.

Fig. 2.— Massifs de jeunes embryons (flèche) obtenus après 2 mois de culture sur le milieu standard contenant du saccharose $0, 3 \text{ M}$.

Fig. 3.— Massif d'embryons en cours de prétraitement sur le milieu standard contenant du saccharose $0, 75 \text{ M}$.

Fig. 4 et 5.— Reprise de l'embryogenèse adventive (Fig. 4) et production de pousses feuillées (Fig. 5) à partir de massifs d'embryons congelés dans l'azote liquide.

● *Culture des embryons*

La méthode mise au point par Monnier (1976) pour l'embryogenèse de *Capsella bursa-pastoris* a pu être appliquée dans le cas du colza comme l'avaient déjà montré Finkelstein et Crouch (1984). Les siliques sont prélevées sur les plantes à différents stades de maturation. Les embryons sont disséqués stérilement et placés sur le milieu de culture Monnier (Monnier, 1976) enrichi par 120 g.l⁻¹ de saccharose (0,35 M), 400 mg.l⁻¹ de glutamine et les vitamines B1 et B6 à la concentration de 10⁻⁷ M. La culture des embryons s'effectue en boîtes de Petri (diamètre 55 mm) sur le milieu solidifié par du Bacto-agar (Difco) à la concentration de 7 g.l⁻¹, à l'obscurité et à 24°C.

● *Choix des embryons pour les expériences de congélation*

Les embryons dont la taille au moment du prélèvement est supérieure ou égale à 100 µm évoluent tous uniformément en plantules durant leur culture *in vitro*. Par contre, les embryons globulaires inférieurs à 100 µm (Fig. 6) présentent un taux de mortalité important, sans doute dû à la difficulté de manipulation de telles structures. En particulier, le suspenseur nécessaire au développement embryonnaire (Monnier, 1984) est souvent lésé. Ne seront donc utilisés dans les expériences suivantes que les embryons mesurant de 100 µm à 1 mm. Nous avons effectué des cultures avec le milieu Monnier (0,35 M de saccharose) sous forme solide (addition de 7 g.l⁻¹ d'agar) ou sous forme liquide ; les embryons s'y développent de façon semblable. On peut donc considérer que les passages de 24 heures dans le milieu liquide avant et après le traitement par le DMSO n'influencent pas la survie des embryons. La survie des embryons est considérée comme effective lorsqu'une croissance a été observée après 6 jours de culture.

● *Obtention de plantules*

Les embryons obtenus *in vitro* sont transférés sur le milieu de base Monnier additionné de saccharose 0,15 M et réparti en petites boîtes de Petri à l'apparition des cotylédons. Leur culture s'effectue alors à la lumière sous une photopériode de 16 heures ; l'éclairage artificiel est fourni par des tubes fluorescents « True-Lite » qui reconstituent le spectre visible et ultra-violet ($\cong 15 \text{ W.m}^{-2}$). Après 8 jours, chaque embryon est repiqué dans un tube contenant du milieu Monnier à 0,05 M de saccharose et 1 mg.l⁻¹ de BAP (benzyl-amino-purine). Lorsque la caulogénèse est suffisante, on transfère chaque plantule dans un tube dont le milieu est stimulant de la rhizogénèse (milieu Monnier + 0,05 M de saccharose + 0,2 mg.l⁻¹ d'acide naphthalène-acétique). Plusieurs repiquages peuvent être effectués à ce stade afin d'obtenir un enracinement suffisant pour le transfert des plantules en culture en terre.

● *Méthode de congélation*

Les embryons devant subir un traitement de congélation sont mis dans un premier temps en culture durant 24 heures dans le milieu liquide de Monnier (0,35 M). Le cryoprotecteur utilisé, le DMSO (diméthylsulfoxyde) est ajouté en 10 fois à raison d'une injection toutes les 5 minutes à la température de 0°C. Les embryons présents dans la solution cryoprotectrice sont laissés 1 heure sur la glace. Ils sont ensuite aspirés dans des paillettes stériles de 1 ml. Une vitesse de refroidissement élevée est obtenue en plongeant les paillettes directement dans l'azote liquide. Pour les vitesses faibles, les paillettes sont placées dans l'enceinte d'un congélateur biologique programmable (marque CFPO, type Minicool) préalablement refroidie à 0°C. La cristallisation est induite à -3°C en mettant en contact chaque paillette avec l'extrémité d'une pince plongée dans l'azote liquide. Les échantillons sont alors refroidis suivant la vitesse choisie jusqu'à -100°C, température à laquelle une stabilisation d'une durée de 15 minutes (plateau) est effectuée. Les paillettes sont ensuite placées dans l'azote liquide. Le réchauffement est réalisé

en agitant doucement les paillettes dans un bain-marie à 40°C pendant 15 secondes. Le contenu des paillettes est alors réparti dans des boîtes de Petri contenant 5ml de milieu liquide. Après 24 heures, les embryons sont prélevés et mis en culture sur le milieu solidifié par l'agar (milieu Monnier 0, 35 M).

2/ Résultats

Tableau 3.— Survie des embryons zygotiques de colza après congélation dans l'azote liquide en fonction des différentes vitesses de refroidissement et des différentes concentrations de DMSO utilisées.

(DMSO)	Vitesse de refroidissement	Nombre d'embryons mis en culture	Nombre d'embryons présentant une croissance après 6 jours	Pourcentage de survie des embryons
5 %	Témoin 0°C min ⁻¹	25	20	80
	1°C min ⁻¹	50	0	0
	5°C min ⁻¹	48	0	0
	10°C min ⁻¹	54	3 formations toupie	6
	rapide	46	12	26
7,5 %	Témoin 0°C min ⁻¹	47	37	78
	10°C min ⁻¹	46	0	0
	rapide	42	17	40
10 %	Témoin 0°C min ⁻¹	41	31	75
	10°C min ⁻¹	49	0	0
	rapide	42	11	26

• Action du cryoprotecteur

Le DMSO est choisi comme cryoprotecteur du fait de sa large utilisation en congélation humaine, animale et végétale (King et Roberts, 1979) et plus particulièrement dans le cas des embryons zygotiques (Withers, 1980 et 1982a). En raison de l'éventuelle toxicité de ce produit (Fahy, 1984), un témoin est réalisé afin de mettre en évidence l'action de différentes concentrations de DMSO sur les embryons zygotiques de colza. Pour cela, les embryons sont manipulés comme pour le cas d'une congélation mais après leur séjour pendant 1 heure dans les paillettes sur la glace, ils sont réchauffés à température ambiante et mis en culture. On a observé qu'au delà d'une concentration de 10 %, le DMSO devient léthal pour les embryons. Entre 5 et 10 % de DMSO, 78 % des embryons en moyenne survivent au traitement. Aucun stade embryonnaire ne présente de sensibilité particulière au DMSO. Les plantules régénérées se développent normalement après transfert sur les différents milieux organogènes (milieux Monnier 0, 15 M ; Monnier 0, 05 M BAP ; Monnier 0, 05 M ANA). On assiste donc dans le cas des embryons zygotiques de colza à une réponse de tout ou rien au traitement avec le DMSO : aux concentrations élevées (15 et 20 %), la toxicité est complète ; aux concentrations plus faibles, on constate

au contraire une inocuité du cryoprotecteur. Le DMSO a donc été utilisé pour la cryoconservation des embryons zygotiques de colza comparativement à des concentrations de 5, 7,5, 10 % (v/v).

● *Influence de la vitesse de refroidissement*

Une vitesse élevée de congélation permet la survie des embryons pour les trois concentrations en DMSO utilisées. Cette technique de congélation, les paillettes étant plongées directement dans l'azote liquide, conserve à l'embryon toutes ses potentialités organogènes. Aux vitesses plus faibles de congélation, le matériel subit une détérioration complète (pour 1 et 5°C min⁻¹) ou partielle (pour 10°C min⁻¹). Lorsque les embryons, protégés par du DMSO à 5 %, subissent une descente ménagée en température, on assiste ensuite, lors de leur culture, à une profifération cellulaire au niveau de l'axe hypocotyle (Fig. 7 et 8). On obtient ainsi après 6 jours de culture, des formes de «toupie». Withers (1983) avait déjà montré, sur les embryons immatures de céréales, que la congélation rapide favorise la germination tandis que les congélations lentes et à sec provoquent une callogenèse. Une même vitesse de refroidissement convient à tous les stades embryonnaires étudiés. Aucune différence de croissance ou de développement n'a été relevée.

● *Devenir des embryons congelés*

Des plantules normales ont été obtenues à partir des embryons vivants après leur congélation suivant la méthode précédemment décrite.

DISCUSSION – CONCLUSION

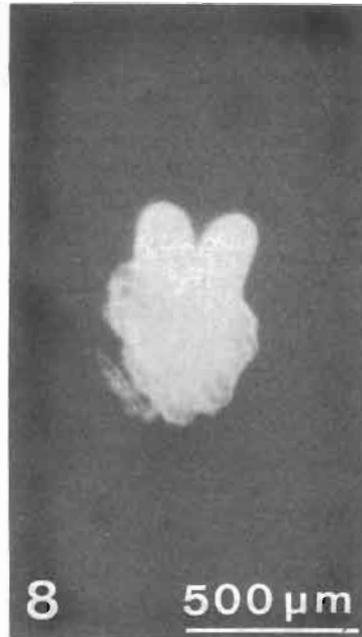
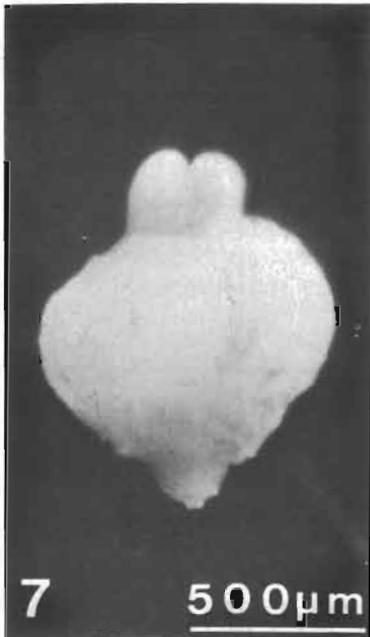
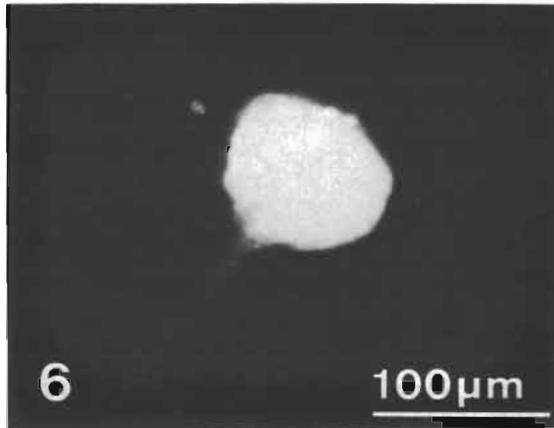
Pour les embryons somatiques de palmier à huile, les conditions optimales des différentes phases du processus de congélation proposé sont les suivantes :

- Prétraitement : milieu standard additionné de saccharose 0, 75 M pendant 7 jours.
- Congélation : 0, 5°C min⁻¹ à 200°C min⁻¹ jusqu'à -100°C, puis immersion des ampoules dans l'azote liquide.
- Réchauffement : rapide.
- Post-traitement : 1 semaine sur milieu standard contenant du saccharose 0, 3 M puis 2 semaines sur saccharose 0, 1 M, avec 2, 4 D 10⁻⁶ M.
- Réponse : taux de survie de 50 à 80 %, sans liaison avec la vitesse de refroidissement ; reprise de la prolifération des massifs d'embryons comprise entre 0 et 20 % suivant la vitesse de congélation et le clone considéré.

Dans le cas des embryons zygotiques de colza, ces conditions sont totalement différentes :

- Prétraitement : 24 heures sur le milieu de Monnier 0, 35 M.
- Traitement cryoprotectant : DMSO 5 à 10 % pendant 2 heures.
- Congélation : rapide, par immersion directe des paillettes dans l'azote liquide.
- Réchauffement : rapide.
- Post-traitement : repiquage sur milieu de culture standard.
- Réponse : 25 à 40 % d'embryons vivants une semaine après la congélation, qui se développent en plantes entières.

Les 2 méthodes de congélation présentées précédemment illustrent bien la diversité des techniques et des conditions optimales de chacune des étapes d'un processus de congélation. Sept points principaux peuvent conditionner le succès ou l'échec de la cryoconservation d'embryons :



Figures 6 - 7 - 8

Fig. 6.— Embryon globulaire de colza avec suspenseur.

Fig. 7 et 8.— Formations anormales obtenues après congélation lente des embryons zygotiques de Colza.

Espèce/génotype

– Espèce : L'étude du tableau 1 nous montre qu'une méthode de congélation est plus ou moins difficile à mettre au point selon l'espèce considérée. Ainsi, les réponses obtenues après décongélation d'embryons zygotiques sont très différentes : avec *Brassica napus* ou *Gossypium arboreum*, on n'observe qu'une callogenèse. Des plantes entières ont été produites chez *Triticale*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa* après passage par un stade cal. L'obtention directe d'une plante entière par le développement direct de l'embryon congelé n'a été réalisée jusqu'à présent que chez *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Elaeis guineensis* et maintenant *Brassica napus* (voir paragraphe précédent).

– Génotype : Les résultats présentés dans cet article qui concernent la congélation d'embryons somatiques de palmier à huile, illustrent parfaitement le rôle important du génotype : les taux de reprise diffèrent en effet entre les 2 clones étudiés.

Taille et stade de développement

Pour leur cryoconservation, les embryons doivent être utilisés aux premiers stades de leur développement (Withers, 1980 ; Henshaw, 1982 ; Engelmann et coll., 1985). Ils doivent être suffisamment petits (stades globulaire, cœur, torpille) et formés de cellules méristématiques pour résister, dans leur intégralité, à la congélation, mais suffisamment développés pour pouvoir être cultivés *in vitro* ; ainsi, les embryons zygotiques de colza doivent avoir une taille minimale de 100 μm . Les embryons déjà trop différenciés ne survivent que partiellement à la congélation et ne peuvent donner directement de plantes entières, sans passage par une phase de callogenèse intermédiaire (Withers, 1979).

Teneur en eau et déshydratation

Pour résister à la congélation, les embryons doivent pouvoir supporter une déshydratation partielle préalable. C'est le cas notamment des embryons zygotiques de palmier à huile (Grout et coll., 1983), d'orge (Withers, 1982), ou des embryons somatiques de palmier à huile (Engelmann et coll., 1985). Withers (1982) attribue principalement à une mauvaise résistance à la déshydratation les difficultés rencontrées pour la congélation d'embryons zygotiques de colza.

Nature et concentration des agents cryoprotecteurs

Les substances cryoprotectrices doivent être utilisées à une concentration non toxique pour le matériel. Ainsi, les embryons zygotiques de colza supportent des concentrations de DMSO pouvant aller jusqu'à 10 % ; les concentrations plus fortes sont toxiques. Comme l'indique le tableau 1, le DMSO est très couramment employé dans une gamme de concentration de 5 à 15 % (*Daucus carota*, *Atropa belladonna*, *Petunia hybrida*, *Hordeum vulgare*, etc.). Suivant les cas, il peut être associé à d'autres agents cryoprotecteurs, tels que le saccharose et/ou le glycérol (*Arachis hypogea*, *Primula obconica*, *Triticale*, *Triticum aestivum* etc.). L'utilisation de mélanges de cryoprotecteurs en faibles concentrations est parfois moins toxique et plus efficace que l'emploi d'un des constituants du mélange à la concentration totale (Finkle et coll., 1985). Au contraire, pour les embryons somatiques de palmier à huile, le saccharose est utilisé seul, à forte concentration (0,75 M). L'addition de DMSO ou son remplacement total ou partiel par du sorbitol n'améliorent pas les résultats.

Méthode et vitesse de congélation

Différentes méthodes de congélation peuvent être utilisées : l'immersion directe du matériel dans l'azote liquide (embryons zygotiques de *Brassica napus*, *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis*, etc.), la congélation en ampoule, à sec (embryons somatiques de palmier à huile) ou en milieu liquide (*Arachis hypogea*, *Arachis villosa*, *Triticale*, etc.), ou bien la congélation en paillettes pour les embryons zygotiques de colza. Les vitesses

de congélation peuvent également varier de plusieurs milliers de degrés par minute lors d'une congélation ultra-rapide à 0, 5°C ou 1°C min⁻¹ lors de congélations lentes (embryons somatiques de palmier à huile), vitesses obtenues par l'emploi de congélateurs programmables.

Une méthode et une vitesse de congélation optimales doivent être définies plus ou moins précisément selon le matériel considéré. Ainsi, seule une congélation rapide permet pour l'instant la survie d'embryons zygotiques de colza ou de blé (Bajaj, 1980). Par contre, les embryons zygotiques d'orge (Withers, 1981) ou les embryons zygotiques de palmier à huile supportent une large gamme de vitesses de refroidissement. Pour Withers (1982), ce résultat est principalement dû au fait que les embryons zygotiques d'orge supportent facilement une déshydratation importante.

Réchauffement

Le réchauffement est une phase importante des processus de cryoconservation. Le réchauffement rapide généralement pratiqué permet d'éviter la recristallisation de la glace lors de la remontée en température. Withers (1979) indique qu'un réchauffement lent peut être utilisé pour des structures de taille importante, car il permettrait notamment un réchauffement plus uniforme du matériel.

Post-traitement

Le post-traitement, c'est-à-dire la culture du matériel après sa décongélation, est une phase dont l'importance est souvent sous-estimée. Des modifications, mêmes mineures, de ses conditions peuvent avoir des conséquences essentielles sur le succès de la cryoconservation d'une espèce donnée. Ainsi, après la décongélation d'embryons zygotiques de maïs, l'incorporation de charbon actif au milieu de culture empêche la callogenèse et permet ainsi aux embryons de se développer directement en plantules (Withers, 1978). La modification de la composition hormonale du milieu de post-traitement peut également être importante : seule l'adjonction de 2,4-D (10⁻⁶ M) pendant 3 semaines après leur décongélation conduit à la reprise de la prolifération de massifs d'embryons somatiques de palmier à huile (Engelmann et coll., 1985).

Des plantes entières ont déjà été obtenues à partir d'embryons zygotiques, polliniques, nucellaires et somatiques d'espèces végétales très diverses. Les perspectives de recherche pour l'application des techniques de cryoconservation à des matériels nouveaux ou l'amélioration des résultats présentés dans cet article concernent la définition des conditions optimales, pour une espèce donnée, des divers paramètres discutés précédemment.

La cryoconservation des embryons a des applications immédiates pour la conservation des espèces à graines récalcitrantes, des embryons somatiques produits par la culture *in vitro* ainsi que pour celle d'embryons hybrides provenant de croisements normalement stériles.

En résumé, la cryoconservation des embryons doit être envisagée pour conserver le matériel génétique des espèces à semences récalcitrantes, des plantes sélectionnées ou des génotypes rares.

BIBLIOGRAPHIE

- AMMIRATO P.V., 1984.— Embryogenesis. *In* : Handbook of plant cell culture, vol. 1, Techniques for propagation and breeding. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada édés. Macmillan, New York, 82-123.
- BAJAJ Y.P.S., 1976.— Gene preservation through freeze-storage of plant cell, tissue, and organ culture. *Acta. Hortic.*, 63, 75-84.

- BAJAJ Y.P.S., 1977.— Survival of *Atropa* and *Nicotiana* pollen-embryos at -196°C . *Curr. Sci.*, 46 (9), 305-307.
- BAJAJ Y.P.S., 1978a.— Effect of super-low temperature on excised anthers and pollen-embryos of *Atropa*, *Nicotiana* and *Petunia*. *Phytomorphology*, 28 (2), 171-176.
- BAJAJ Y.P.S., 1978b.— Regeneration of plants from pollen-embryos frozen at ultra-low temperatures - a method for the preservation of haploids. 4th Int. Palynol. Cong., Lucknow, India, 1, 343-346.
- BAJAJ Y.P.S., 1980a.— Induction of androgenesis in rice anthers frozen at -196°C . *Cereal Res. Commun.*, 8 (2), 365-369.
- BAJAJ Y.P.S., 1980b.— Freeze-preservation of plant cells - a novel approach to the conservation of germplasm. *In* : Genetics and wheat improvement. A.K. Gupta éd. Oxford and IBH Publ., New-Delhi, 141-149.
- BAJAJ Y.P.S., 1981a.— Regeneration of plants from ultra-low frozen anthers of *Primula obconica*. *Sci. Hortic.*, 14, 93-95.
- BAJAJ Y.P.S., 1981b.— Growth and morphogenesis in frozen (-196°C) endosperm and embryos of rice. *Curr. Sci.*, 50 (21), 947-948.
- BAJAJ Y.P.S., 1982.— Survival of anther - and ovule - derived cotton callus frozen in liquid nitrogen. *Curr. Sci.*, 51 (3), 139-140.
- BAJAJ Y.P.S., 1983a.— Regeneration of plants from pollen-embryos of *Arachis*, *Brassica* and *Triticum* spp. cryopreserved for one year. *Curr. Sci.*, 52 (10), 484-486.
- BAJAJ Y.P.S., 1983b.— Résultats non publiés.
- BAJAJ Y.P.S., 1983c.— Résultats non publiés.
- BAJAJ Y.P.S., 1984.— Technology of cryopreservation of germplasm of cereals. *In* : Proc. Int. Wheat Genet. Symp., Kyoto, sous presse.
- BAJAJ Y.P.S., 1985.— Cryopreservation of embryos. *In* : Cryopreservation of plant cells and organs. K.K. Kartha éd., CRC Press, Boca Raton, Florida, 228-242.
- BAYLISS M.W., 1980.— Chromosomal variation in plant tissues in culture. *Int. Rev. Cytol.*, Suppl. 11 A, 113-144.
- CORLEY R.H.V., J.H. BARRETT et L.H. JONES, 1976.— Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. *In* : Int. Dev. Oil Palm, Proc. Malays. Int. Agric. Oil Palm Conf., 1-7.
- COULIBALY Y. et Y. DEMARLY, 1979.— Androgenèse *in vitro* chez *Oryza sativa* var. Cigalon à partir d'anthers conservées dans l'azote liquide. *Agro. Trop.*, XXXIV (1), 74-79.
- DOUGALL D.L. et D.F. WETHERELL, 1974.— Storage of wild carrot cultures in the frozen state. *Cryobiology*, 11, 410-415.
- ENGELMANN F., Y. DUVAL et J. DEREUDDRE, 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, sér. III, 111-116.
- FAHY G.M., 1984.— Cryoprotectant toxicity reduction : specific or non specific ? *Cryo-Letters*, 5, 287-294.
- FINKELSTEIN R.R. et M.L. CROUCH, 1984.— Precociously germinating rapeseed embryos retain characteristics of embryogeny. *Planta*, 162, 125-131.
- FINKLE B.J., M.A. ZAVALA et J.M. ULRICH, 1985.— Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. *In* : Cryopreservation of plant cells and organs. K.K. Kartha éd., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 75-113.
- GROUT B.W.W., K. SHELTON et H.W. PRITCHARD, 1983.— Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann. Bot.*, 52, 381-384.
- HANOWER J. et C. PANNETIER, 1982.— *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. *In* : Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, A. Fujiwara éd., Tokyo, 745-746.
- HENSHAW G.G., 1982.— Tissue culture methods and germplasm storage. *In* : Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, A. Fujiwara éd., Tokyo, 789-792.
- KASHA K.J., L. KOTT et G. SEGUIN-SCHWARTZ, 1982.— Genetic stability of haploid cell culture. *In* : Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, A. Fujiwara éd., Tokyo, 405-408.
- KING M.W. et E.H. ROBERTS, 1979.— The storage of recalcitrant seeds - Achievements and possible approaches. IBPGR report, AGP : IBPGR/79/44. Rome : IBPGR Secretariat., 96p.
- KITTO S.L. et J. JANICK, 1985a.— A citrus embryo assay to screen water - soluble resins as synthetic seed coats. *HortScience*, 20 (1), 98-100.

- KITTO S.L. et J. JANICK, 1985b.— Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110 (2), 277-282.
- KITTO S.L. et J. JANICK, 1985c.— Hardening treatments increase survival of synthetically coated asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110 (2), 283-286.
- MONNIER M., 1976.— Culture *in vitro* de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* Moench. *Rev. Cyt. Biol. Végét.*, 39, 1-120.
- MONNIER M., 1984.— Survival of young immature *Capsella* embryos cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.*, 115, 105-113.
- MONNIER M. et C. LEDDET, 1980.— Action du saccharose sur la résistance au gel des embryons immatures de Capselle. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 127 (3/4), 71-77.
- NOIRET J.M., J.P. GASCON et C. PANNETIER, 1985.— Perspectives de production de vitro-plants de palmier à huile. *Cahiers des Ingénieurs Agronomes INA-PG*, 382 (Spécial Biotechnologies) (1), 57-64.
- PANNETIER C., P. ARTHUIS et D. LIEVOUX, 1981.— Néoformation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Okéagineux*, 36 (3), 119-122.
- RABECHAUT H. et J.P. MARTIN, 1976.— Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. *C. R. Acad. Sc. Paris, sér. D*, 283, 1735-1737.
- REISCH B., 1984.— Genetic variability in regenerated plants. *In* : *Hand book of plant cell culture*, vol.1, Techniques for propagation and breeding, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada éds. Macmillan Publish. Co., New York, 748-769.
- ROBERTS E.H. et M.W. KING, 1980.— Storage of recalcitrant seeds. *In* : *Crop genetic resources - the conservation of difficult material*. L.A. Withers et J.T. Williams éds. *Int. Union Biol. Sci.*, sér. B42, IUBS, Paris, 39-48.
- WITHERS L.A., 1978.— Freeze-preservation of cultured cells and tissues. *In* : *Frontiers of plant tissue culture*, T.A. Thorpe éd., Calgary, IAPTC, 297-306.
- WITHERS L.A., 1979.— Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota*). *Plant Physiol.*, 63, 460-467.
- WITHERS L.A., 1980.— Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR, Technical report, AGP : IBPGR/80/8, Rome : IBPGR Secretariat, 91p.
- WITHERS L.A., 1982a.— Storage of plant tissue cultures. *In* : *Crop genetic resources - the conservation of difficult material*, L.A. Withers et J.T. Williams éds. *Int. Union Biol. Sci.*, sér. B42, IUBS, Paris, 49-82.
- WITHERS L.A., 1982b.— The development of cryopreservation techniques for plant cell, tissue and organ culture. *In* : *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, A. Fujiwara éd., Tokyo, 793-794.
- WITHERS L.A., 1983.— Germplasm storage in plant biotechnology. *In* : *Plant Biotechnology*. S.H. Mantell et H. Smith éds., Society for Experimental Biology Seminar Series 18, Cambridge Univ. Press, 187-218.

Engelmann Florent, Baubault C.

La cryoconservation des embryons somatiques, polliniques et zygotiques.

Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 1986, 133 (3), p. 89-103. ISSN 0181-1789