

Conservation *ex situ* de pollen et de graines, et de cultures *in vitro* de plantes ligneuses pérennes

D'après les travaux de:

B.S.P. Wang

P.J. Charest

B. Downie

ÉTUDE FAO
FORÊTS

113



Ressources naturelles
Canada

Service canadien
des forêts

Natural Resources
Canada

Canadian Forest
Service

Organisation
des
Nations
Unies
pour
l'alimentation
et
l'agriculture



Rome, 1994

Les appellations employées dans cette publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites.

M-31
ISBN 92-5-203385-6

Tous droits réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, mise en mémoire dans un système de recherche documentaire ni transmise sous quelque forme ou par quelque procédé que ce soit: électronique, mécanique, par photocopie ou autre, sans autorisation préalable du détenteur des droits d'auteur. Toute demande d'autorisation devra être adressée au Directeur de la Division des publications, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italie, et comporter des indications précises relatives à l'objet et à l'étendue de la reproduction.

© FAO 1994

AVANT PROPOS

Dans le cadre du Programme ordinaire de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), une revue de la conservation *ex situ* des ressources génétiques forestières a été entreprise au début des années quatre-vingt. Par la suite, la septième session du Groupe d'experts des ressources génétiques forestières de la FAO, tenue en décembre 1989, a recommandé qu'un document à jour soit préparé sur le rôle potentiel de cette stratégie en complément des stratégies de conservation *in situ* d'usage plus courant. Cette recommandation a été faite en considération des nouvelles méthodes et technologies utilisables dans le domaine de la conservation de graines, de pollen et de tissus d'espèces végétales.

Tout en reconnaissant l'utilité des collections vivantes et des peuplements conservatoires *ex situ*, le présent document se concentre sur les méthodes de stockage *ex situ*, et s'appuie sur les travaux d'une équipe de scientifiques de l'Institut forestier national de Petawawa (IFNP) au Canada, et sur des discussions et des contacts avec de nombreux chercheurs à travers le monde. Dans ce domaine qui évolue rapidement, la situation et les perspectives décrites dans le document correspondent à la situation au milieu de l'année 1993.

Nous espérons, dans un proche avenir, publier d'autres informations sur l'établissement et la gestion des peuplements conservatoires *ex situ* qui constituent, avec le stockage, un complément utile à la conservation *in situ* des essences forestières longévives, allogames et fortement hétérozygotes.



J.P. Lanly
Directeur

Division des ressources forestières
Département des forêts

REMERCIEMENTS

La présente étude s'appuie sur le travail de MM. B.S.P. Wang, P.J. Charest and B. Brownie de l'Institut Forestier National de Petawawa(IFNP), Canada. Des remerciements sont adressés aux nombreux chercheurs qui ont répondu aux demandes d'informations. Parmi ceux qui ont envoyé des articles et suggéré des sources d'information figurent D.P. Fowler, P. Copis, T.D. Blush, F.E. Bridgewater, D. Bramlett, M. S. Greenwood, J.N. Owens, J. Webber, C. Franklin, J.P. van Buijtenen, W. Elam, E.E. Benson, F. Engelmann, W.M. Roca, V. Villalobos et L.A. Withers.

Nous remercions tout spécialement L. Towill, C. W. Yeatman (IFNP) et R. Rutledge (IFNP), qui ont bien voulu faire une lecture critique du manuscrit. C. Pensom (IFNP) et M. Mitchell (IFNP) se sont consacrés inlassablement à la recherche des références les plus obscures. E. Andersen a compilé les documents soumis par les différents auteurs, et G. Murray et A. Yapa ont révisé la version finale. C. Palmberg-Lerche, L. Withers, K. Tao et A. Thomsen, ont fait un examen critique du document final,

Nous exprimons également notre reconnaissance au Secrétariat d'État du Canada pour la traduction française et à P. Boross (IFNP) pour la rédaction-révision du texte.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS

REMERCIEMENTS

RESUME ix

| | |
|--|----------|
| 1. INTRODUCTION | 1 |
| 2. CONSERVATION <i>EX SITU</i> DES SEMENCES | |
| Introduction | 5 |
| Facteurs génétiques | 6 |
| Facteurs environnementaux | 11 |
| Qualité initiale de la semence | 11 |
| Teneur en eau des graines | 12 |
| Température de conservation | 16 |
| Méthode de conservation | 16 |
| Cryopréservation | 18 |
| Semences tolérantes à la dessiccation et à l'azote liquide | 19 |
| Semences tolérantes à la dessiccation et sensibles à l'azote liquide | 22 |
| Semences sensibles à la dessiccation et à l'azote liquide | 23 |
| Avantages et inconvénients de conservation des semences | 26 |

| | |
|--|----|
| 3. CONSERVATION <i>EX SITU</i> DE POLLEN | |
| Introduction | 29 |
| Facteurs environnementaux | 32 |
| Qualité initiale | 32 |
| Teneur en eau (TE) | 35 |
| Mode de dessiccation/réhydratation | 37 |
| Traitement avant dessiccation | 40 |
| Température | 40 |
| Nombre de cycles de refroidissement/réchauffement | 42 |
| Emploi de cryoprotecteurs | 43 |
| Atmosphère de conservation | 44 |
| Facteurs génétiques | 44 |
| Variation intraspécifique | 44 |
| Conservation du pollen | 45 |
| Possibilités et limitations | 45 |
| Besoins en matières de recherches | 47 |
| | |
| 4. CONSERVATION <i>EX SITU</i> PAR DES CULTURES <i>IN VITRO</i> | |
| Introduction | 49 |
| Méthodes | 49 |
| Variation somaclonale observée dans les tissus en culture | 54 |
| Maturation précoce des cultures <i>in vitro</i> | 60 |
| Méthodes de conservation des cultures <i>in vitro</i> | 61 |
| Conservation de l'ADN | 66 |
| | |
| 5. CONCLUSION | 69 |
| | |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 75 |

Photo de couverture: Micropropagation du sapin de douglas (*Pseudotsuga menziesii*) à l'AFOCEL, France
(Crédit photographique: C. Paimberg-Lerche, FAO)

RESUME

La sécheresse, les changements climatiques et la déforestation provoquent l'érosion des sols, la désertification et l'appauvrissement de la diversité biologique. Il en résulte une diminution continue de la capacité de la terre, dans de nombreuses parties du monde, de produire les biens et les services nécessaires à la survie de l'homme (FAO, 1989). Il est essentiel et urgent de renverser la tendance actuelle de destruction des forêts, de dégradation des écosystèmes et de disparition des ressources génétiques par une stratégie intégrée de gestion des ressources et de conservation de la diversité biologique. Cela est particulièrement vrai dans les régions tropicales et subtropicales où des écosystèmes complexes et riches en espèces sont rapidement détruits ou transformés, de même que dans les régions arides et semi-arides où des environnements fragiles sont menacés par la pression croissante des populations humaines, des animaux domestiques et des fluctuations climatiques (Palmberg, 1987).

En agriculture, la plupart des espèces cultivées sont conservées par des moyens *ex situ*, banques de semences, collections vivantes et, dans certains cas, culture *in vitro*. En revanche, dans le domaine forestier, à cause de la longue durée de régénération qu'exigent les arbres, l'approche privilégiée pour la conservation est l'intégration des principes de conservation *in situ* à une gestion durable des forêts (Yeatman, 1987), augmentant l'étendue des forêts aménagées et des aires strictement protégées, et en complétant ces mesures par la création de banques de gènes et de peuplements conservatoires *ex situ*. Par ailleurs, les vergers à graines, les jardins botaniques et les arboretums peuvent, dans une certaine mesure, répondre aux besoins en matière de conservation et venir compléter les autres activités de conservation. En dépit des besoins urgents, la conservation génétique dans le cadre de la gestion des ressources forestières ne se développe que lentement et se limite généralement à la création de parcs nationaux et de quelques peuplements conservatoires *ex situ*, vergers à graines et arboretums.

En 1975, le PNUE (Programme des Nations Unies pour l'environnement) et la FAO ont réalisé une étude pilote sur la méthodologie de la conservation à long terme des ressources génétiques forestières dans un contexte global (Roche, 1975). Le rapport de l'étude recommandait que le rôle complémentaire des banques de semences *ex situ* dans la conservation des ressources génétiques soit examiné plus à fond, et mettait en évidence la nécessité d'établir des programmes de recherche, particulièrement dans le domaine de la conservation et de la germination des semences d'arbres tropicaux. Une étude du rôle réel et potentiel des méthodes de conservation *ex situ* a été effectuée pour la cinquième session du Groupe FAO d'experts des ressources génétiques forestières, qui a eu lieu en 1981 (FAO, 1985). À la Septième session du même groupe, en décembre 1989, celui-ci a recommandé que soient mises à jour les études antérieures relativement à la conservation *ex situ* de semences, de pollen et de cultures *in vitro* d'essences forestières, utilisée pour compléter les stratégies de conservation *in situ* (Anon., 1989).

En réponse à la recommandation du groupe, la FAO a confié à l'Institut forestier national de Petawawa, au Canada, de réaliser cette étude.

La conservation en conditions contrôlées de semences est le moyen le plus employé de conservation *ex situ* des arbres forestiers à court terme (3 à 5 ans) et à moyen terme (30 ans ou plus). Généralement, ce moyen est utilisé en complément à des méthodes de conservation *in situ* à long terme (plusieurs dizaines d'années, voire un siècle) et d'autres méthodes de conservation *ex situ* (par ex. des parcelles conservatoires, des banques de clones, des peuplements à semenciers, des vergers à graines). Le succès de conservation de semences, de pollen et de cultures *in vitro* est lié à la longévité inhérente et au comportement physiologique des espèces pendant le stockage (orthodoxe, récalcitrant ou intermédiaire), à la qualité initiale, par exemple à la teneur en eau de la matière stockée, aux méthodes et conditions de conservation.

Des essences aux semences du type orthodoxe (par ex. *Pinus*, *Picea* sp.) ont été conservées avec succès jusqu'à 50 ans dans des conditions de stockage opérationnel normales de +5°C avec une perte de pouvoir

germinatif de 14 à 34%. Avec des procédés améliorés de récolte, manipulation, traitement et stockage des graines, la longévité des semences du type orthodoxe pourrait être portée à une période de 75 à 100 ans. On pourrait y parvenir à l'aide de la cryopréservation. D'autre part, malgré une vingtaine d'années de recherches en vue de trouver des méthodes de stockage efficaces pour conserver les graines d'essences ligneuses vivaces du type récalcitrant, essences parmi lesquelles on trouve nombre d'arbres tropicaux importants (par ex. de nombreuses espèces de Diptérocarpacées) et des espèces industrielles et fruitières (par ex. *Hevea brasiliensis*, *Durio zibethinus*, *Mangifera indica*), seules des méthodes de conservation à court terme ont été mises au point, permettant de faire passer la période de conservation de quelques jours ou quelques semaines à une période de 8 à 12 mois (par ex. *Hevea brasiliensis*, *Theobroma cacao*). Ces résultats ont été obtenus par cryopréservation d'embryons excisés, suivie d'une régénération à l'aide de techniques *in vitro*. Ces méthodes sont trop coûteuses pour des activités à l'échelle opérationnelle, particulièrement dans les pays en voie de développement. D'autres recherches seront nécessaires afin d'élaborer des procédés de conservation de graines ultrasèches sans réfrigération.

Le maintien d'une banque de semences efficace exige des techniques adéquates de contrôle de la faculté germinative du stock de semences. Des rapports consultés recommandent des tests de germination séquentiels; on est à la recherche de techniques non destructrices pour les tests de viabilité. Bien que le Comité sur la conservation du Conseil international des ressources phytogénétiques (1983) ait recommandé une norme de régénération de 85% de viabilité pour la plupart des essences cultivées, il n'existe aucune norme généralement appliquée pour les semences d'arbres forestiers.

Il est important de noter que même si le stockage de graines est possible pendant de longues périodes pour de nombreuses essences d'arbres, la régénération des de semences conservées présentera des difficultés presque insurmontables en raison de la longue période végétative que la plupart des espèces d'arbres connaissent avant de produire des graines, et aussi des grandes superficies nécessaires pour régénérer ces essences

d'une grande longévité, allofécondées et hétérozygotes. Il est donc évident qu'à l'heure actuelle le stockage de semences peut être considéré seulement comme un *complément* de la conservation *in situ* ou de collections vivantes de diverses classes d'âge, constituées sur le terrain et où l'on peut récolter de façon continue des graines (et d'autres matériels de reproduction).

À bien des égards, la conservation du pollen est soumise aux mêmes facteurs que celle des graines. Le comportement physiologique du pollen bicellulaire et tricellulaire pendant conservation est comparable à celui des semences du type orthodoxe et récalcitrant, respectivement. Une des limites possibles du recours à le stockage du pollen pour la conservation génétique est la diminution rapide, observée dans certains cas, de la viabilité des semences produites à partir de pollen entreposé. Jusqu'à ce que l'exactitude du phénomène ait été confirmée, on pourrait avoir recours à le stockage du pollen pour compléter le stockage de semences en tant que moyen de conservation *ex situ*. Dans les recherches futures, il y aurait lieu de se pencher sur la teneur en eau optimale pour la conservation du pollen, le mode de dessiccation et de réhydratation, la température et l'atmosphère de le stockage, ainsi que la nécessité d'employer un cryoprotecteur dans la cryopréservation, et le type à utiliser.

L'utilisation de cultures de tissus et la génération de semences artificielles dans le cadre de la conservation *ex situ* sont des techniques nouvelles. De nombreux textes ont été publiés sur les méthodes de cultures de tissus végétaux, mais cette culture n'a été appliquée à des fins de conservation qu'à des espèces végétales dont l'importance économique est certaine. On manque également d'expérience dans le domaine de la préservation du plasma germinatif par l'utilisation de méthodes de culture de tissus sur une grande échelle. Toutefois, la culture de tissus semble être une méthode appropriée de conservation pour plusieurs classes de plantes; parmi celles-ci figurent des plantes qui ne se propagent que de façon végétative (par ex. le bananier, le manioc, la pomme de terre), des espèces aux graines de type récalcitrant (un grand nombre de bois tropicaux, des essences cultivées industrielles et fruitières), des espèces qui connaissent une longue période végétative avant de produire des graines, et des

individus stériles possédant des caractéristiques importantes souhaitables (par ex., la récolte des embryons chez les hybrides). La culture de tissus constitue en outre un outil pratique dans des opérations telles que l'obtention de propagules hors de la saison de récolte des graines et dans l'éradication des maladies.

Bien que la culture de tissus d'espèces ligneuses vivaces à des fins de conservation semble présenter de nombreux avantages, elle comporte également beaucoup d'inconvénients, par exemple la difficulté d'appliquer la technique à certaines espèces, les variations somaclonales non contrôlées et la maturation rapide des plantes ayant fait l'objet d'une culture de tissus. Cependant, des recherches récentes ont permis de définir des lignes directrices pour limiter les variations somaclonales, et d'autres techniques novatrices, telles que la microgreffe (c'est-à-dire la greffe *in vitro* de méristèmes adultes sur de jeunes porte-greffes), peuvent éventuellement être appliquées à des individus adultes. Des protocoles de culture de tissus peuvent être élaborés pour pratiquement toutes les espèces végétales; toutefois, la conservation à long terme de tissus présente encore des problèmes importants. La cryopréservation (y compris la vitrification) est la seule technique à long terme pour conserver de tels propagules. Cependant, chaque espèce ou groupe d'espèces aura besoin de son propre protocole de stockage, ce qui augmentera les coûts de cette méthode déjà onéreuse.

Le rapport souligne la nécessité d'intégrer les approches *ex situ* et *in situ* dans un plan global de conservation de la diversité génétique, et de tenir compte des avantages de l'éventail des méthodes existantes. Si elles sont utilisées judicieusement, les méthodes examinées dans le présent document devraient contribuer de façon significative à la conservation de ressources génétiques précieuses d'espèces ligneuses vivaces.

Il est indispensable de perfectionner les techniques de culture et de cryopréservation, la culture de tissus *in vitro*, et conservation de semences artificielles lorsque la matière est desséchée à des niveaux comparables à ceux des semences du type orthodoxe séchées en vue de le stockage, afin que ces méthodes soient suffisamment efficaces pour répondre aux

besoins en matière de conservation à moyen et à long termes. La recherche sur la culture de tissus devrait être étendue à l'élaboration de protocoles pour la propagation d'un éventail d'espèces non commerciales et centrée sur la mise au point de méthodes de conservation peu coûteuses, par exemple les semences artificielles.

Lorsqu'on évalue l'efficacité et les limites des méthodes *ex situ* existantes pour la conservation génétique d'espèces ligneuses vivaces, il devient évident que, dans l'état actuel des connaissances, la conservation de pollen, ou de semences de type récalcitrant et la culture *in vitro* ne sont viables que comme mesures à court terme. La seule méthode de conservation *ex situ* sûre pouvant actuellement être utilisée sur une grande échelle à moyen et à long termes pour les espèces forestières est la conservation de semences du type orthodoxe. Celles-ci peuvent être généralement conservées pendant de longues périodes par l'application de méthodes de cryopréservation. Cependant, dans tous ces cas, les problèmes relatifs à la régénération des graines conservées, mentionnés plus haut, ne doivent pas être négligés. Conservation pourrait ne pas être en soi le problème le plus difficile, dans les stratégies de conservation *ex situ* à long terme.

Les recherches futures devraient porter sur les domaines suivants:

1. L'élaboration de protocoles adéquats pour le tri et l'identification précise des espèces à semences du type véritablement récalcitrant. Pour ce faire, nous devrions examiner les taux de dessiccation par rapport aux taux subséquents de germination, accordant une attention particulière aux techniques de dessiccation n'utilisant pas l'air chauffé.
2. Si les semences ne peuvent être séchées sans dommage, leur tolérance à la cryopréservation devrait alors être vérifiée. Ce processus comportera l'évaluation des gradients de température des tissus dans le temps et dans l'espace, de la pénétration des cryoprotecteurs, de la possibilité d'utiliser des embryons excisés, et de la praticabilité des techniques de lyophilisation.

3. Pour améliorer l'efficacité de la cryopréservation, on devrait étudier les effets de la température de stockage cryogénique et ceux de la teneur en eau des graines sur la dormance provoquée.
4. L'élaboration de méthodes de conservation améliorées est nécessaire pour accroître la longévité des semences d'espèces dont on a déterminé qu'elles avaient un «comportement de conservation intermédiaire».
5. On devrait s'efforcer d'améliorer les méthodes de conservation conventionnelles des graines humides à des températures ambiantes ou sub-ambiantes, notamment par l'élaboration de moyens de contrôle des attaques microbiennes, l'inhibition de la germination avec des produits chimiques, et l'évaluation des besoins d'oxygène.
6. Compte tenu du coût élevé de banques de semences réfrigérées (problème qui concerne tout particulièrement les pays en voie de développement), il est urgent de mettre au point des méthodes de stockage de semences ultra sèches à des températures ambiantes ou sub-ambiantes.
7. Il faudrait envisager d'autres stratégies pour le stockage de semences à comportement récalcitrant, par exemple la création de banques de semis, de peuplements conservatoires *ex situ* et de vergers à graines.
8. L'élaboration de méthodes de culture de tissus pour des essences non commerciales et la recherche des facteurs critiques déterminant la réussite de la culture de tissus afin de permettre le transfert des techniques d'une espèce à l'autre.
9. L'établissement de procédés peu coûteux de conservation par culture de tissus qui conviennent à la conservation des arbres à long terme. L'expérimentation de processus naturels tels que la dessiccation des embryons zygotiques au cours de la maturation des graines, et leur reproduction *in vitro*, pourraient éventuellement suggérer des modes de conservation peu coûteux.

Chapitre I INTRODUCTION

La sécheresse, les changements climatiques et la déforestation provoquent l'érosion des sols, la désertification et un appauvrissement de la diversité biologique. Il en résulte une diminution régulière de la capacité de la terre, dans de nombreuses parties du monde, de produire les biens et les services nécessaires à la survie de l'homme (FAO, 1989). Il est essentiel et urgent de renverser la tendance actuelle à la destruction des forêts, à la dégradation des écosystèmes et à la disparition des ressources génétiques par une stratégie intégrée de gestion des ressources et de préservation de la diversité biologique. Cela est particulièrement vrai dans les régions tropicales et subtropicales, où des écosystèmes complexes et riches en espèces sont rapidement détruits ou transformés, et dans les régions arides et semi-arides où des environnements fragiles sont menacés par la pression croissante des populations humaines, des animaux domestiques et des fluctuations climatiques (Palmberg, 1987).

Les deux stratégies courantes de conservation des ressources génétiques végétales sont la conservation *in situ*, qui permet à l'évolution de se poursuivre dans le milieu naturel, et la conservation *ex situ*, qui préserve les plantes hors de leur habitat naturel. La conservation *ex situ* comporte un degré de protection plus élevé et, par conséquent, une plus grande isolation du plasma germinatif que dans la conservation *in situ* (Withers, 1990c).

En agriculture, la plupart des espèces cultivées sont conservées par des moyens *ex situ*, banques de semences, conservation en champs et, dans certains cas, culture de tissus. À l'opposé, dans en foresterie, à cause de la longue période de régénération qu'exigent les arbres, on préfère, pour conserver les forêts, mettre un frein à leur destruction en intégrant des principes de conservation *in situ* à une gestion durable des forêts (Yeatman, 1987), accroître l'étendue des réserves forestières gérées et des secteurs strictement protégés, et compléter ces mesures par la création de banques génétiques *ex situ* et de peuplements conservatoires. Par ailleurs, les vergers à graines, les jardins botaniques et les arboretums peuvent,

dans une certaine mesure, répondre aux besoins en matière de conservation et venir s'ajouter à d'autres activités de conservation. En dépit des besoins urgents, la conservation génétique appliquée dans le cadre de la gestion des ressources forestières ne se développe que lentement et se limite généralement à la création de parcs nationaux et de quelques peuplements sérenciers et conservatoires, vergers à graines et arboretums *ex situ*.

Dans les tropiques, la conservation *ex situ* des ressources génétiques forestières est devenue chose courante en raison du taux alarmant de déforestation et de la disparition d'espèces et de provenances. Cette activité de conservation prend presque uniquement la forme de peuplements conservatoires d'espèces et de provenances dont la valeur est reconnue (Palmberg, 1987).

En 1975, le PNUE et la FAO ont réalisé une étude pilote sur la méthodologie de conservation à long terme des ressources génétiques forestières dans un contexte global (Roche, 1975). Le rapport de l'étude recommandait que le rôle complémentaire des banques de semences dans la conservation des ressources génétiques soit examiné plus à fond, et déterminait la nécessité d'établir des programmes de recherche, particulièrement dans le domaine de l'analyse, de la conservation et de la régénération des semences d'arbres tropicaux. Une étude du rôle réel et potentiel des méthodes de conservation *ex situ* a été effectuée pour la cinquième session du Groupe FAO d'experts des ressources génétiques forestières, réunie en 1981 (FAO, 1985). À la Septième session du même groupe, en décembre 1989, celui-ci a recommandé que les études antérieures sur la conservation *ex situ* de semences et de pollen et les cultures *in vitro* d'essences forestières soient mises à jour (FAO, 1986). En réponse, la FAO a confié à l'Institut forestier national de Petawawa, Chalk River (Ontario), Canada, la réalisation de cette étude.

Le présent rapport est le fruit de cette étude. Seules les techniques de conservation *ex situ* de pollen, de semences, et la culture *in vitro* d'espèces ligneuses vivaces y sont étudiées, et l'accent est mis tout particulièrement sur les avantages et les inconvénients. Les arboretums et

3.

des banques de semis et des parcelles conservatoires ne sont pas discutés en détail dans ce document.

Chapitre II

CONSERVATION *EX SITU* DES SEMENCES

INTRODUCTION

La conservation en conditions contrôlées des semences est la stratégie de conservation *ex situ* des arbres forestiers la plus employée à court terme (3 à 5 ans) et à moyen terme (30 ans ou plus). Généralement, cette stratégie sert à compléter des méthodes de conservation à long terme *in situ* et d'autres méthodes de conservation *ex situ*, (par ex., les peuplements *ex situ*, les banques de clones, les vergers à graines). On procède ainsi à cause de la difficulté, par rapport aux espèces agricoles, de régénérer les semences d'espèces ligneuses conservées, lorsque leur faculté germinative passe sous certains niveaux. Néanmoins, la conservation de semences pour une durée équivalente à une rotation est possible pour de nombreuses essences ligneuses, et cette méthode pourrait offrir des possibilités intéressantes pour la conservation *ex situ* en général (Bonner, 1983). Le maintien d'une banque de semences de bon rendement exige des techniques efficaces de contrôle de la faculté germinative des stocks de semences. Les rapports étudiés recommandent de procéder à des tests de germination séquentiels; on cherche actuellement des techniques non destructrices pour vérifier la viabilité. Même si le Comité sur la conservation du Conseil international des ressources phylogénétiques (IBPGR, 1983) a recommandé comme norme de régénération un taux de viabilité de 85% pour la plupart des cultures, il n'existe aucune norme s'appliquant de manière générale aux semences d'arbres forestiers. Les avantages et inconvénients de le stockage de semences comme complément de la conservation génétique d'essences ligneuses ont été exposés par Wang (1975), King et Roberts (1979) Chin et Roberts (1980), Yeatman (1987), Chin (1988) et Bonner (1990). Le présent document porte sur l'évolution récente des exigences et de la technologie en matière de la conservation de semences, et traite des possibilités et des limites de stockage de semences en tant que méthode potentielle de stockage à long terme du plasma germinatif des espèces ligneuses.

L'objectif de conservation de semences, pour conserver le plasma germinatif des espèces forestières, est de préserver la qualité génétique et

physiologique initiale des semences jusqu'à ce qu'on les utilise ou qu'elles puissent être régénérées. Il faut pour cela évaluer les principaux facteurs génétiques et environnementaux qui ont une incidence sur les semences des espèces forestières stockées.

FACTEURS GÉNÉTIQUES

La longévité des semences, du pollen ou des tissus des espèces ligneuses stockées est contrôlée génétiquement et varie selon les espèces, même dans le cas de conditions de conservation optimales. Jusqu'à tout récemment, les semences étaient groupées en deux catégories en fonction de leur comportement lorsqu'elles sont stockées: orthodoxe et récalcitrant (Roberts, 1973). Plus récemment, une troisième catégorie, représentée par le caféier arabica (*Coffea arabica* L.), dont le comportement lorsque stocké se situe entre celui des semences du type orthodoxe et celles du type récalcitrant, a été découvert par Ellis *et al.* (1990). Bonner (1990) a classé les semences des espèces ligneuses en quatre catégories en fonction de leur physiologie lorsqu'elles sont stockées : (1) orthodoxe véritable, (2) sous-orthodoxe, (3) récalcitrant des régions tempérées, et (4) récalcitrant des régions tropicales.

Les semences du type orthodoxe véritable supportent la dessiccation et les basses températures et restent viables pendant de longues périodes lorsqu'elles sont stockées dans un endroit sec et frais. Parmi les genres d'arbres produisant ce type de semence, on peut citer *Abies*, *Betula*, *Acacia*, *Eucalyptus*, *Fraxinus*, *Larix*, *Paraserianthus*, *Picea*, *Pinus*, *Platanus*, *Prosopis*, *Prunus*, *Pseudotsuga* et *Tsuga*. Les semences stockées de cette catégorie ont une longue durée de vie pouvant atteindre 50 ans. Comme l'a souligné Bonner (1990), les données fiables sur le stockage à long terme des semences de type orthodoxe véritable d'espèces ligneuses sont rares. Notre tableau 1 complète le tableau 1 de Bonner (1990) par des données supplémentaires inédites provenant du Centre national des semences forestières de l'Institut forestier national de Petawawa.

TABLEAU 1.

Longévité de certaines semences forestières du type orthodoxe véritable

| Espèces | Teneur en eau (% du poids frais) | Température de conservation (°C) | Durée de conservation (années) | Perte de viabilité (%) | Référence |
|--|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| <i>Abies balsamea</i> | 10 | 2-4 | 15 | 21 | Wang, don. in. |
| <i>A. lasiocarpa</i> | 4,9 | 2-4 | 9 | 9 | Wang, don. in. |
| <i>A. procera</i> | 9 | 0 | 7 | 11 | Allen 1957 |
| <i>Acacia leptopetala</i> | - | 20-25 | 18 | 1 | Doran et collab. 1983 |
| <i>A. mangium</i> | - | 4-8 | 1,2 | 6 | Tap et Wong 1983 |
| <i>A. pruinocarpa</i> | - | 20-25 | 16 | 20 | Doran <i>et al.</i> 1983 |
| <i>Acer rubrum</i> | 8,5-11,6 | 2-4 | 4-15 | 100 | Wang, don. in. |
| <i>A. saccharum</i> | 10 | -10 | 5,5 | 5 | Carl 1976 |
| <i>Albizia (Paraserianthus) falcataria</i> | - | 4-8 | 1,5 | 10 | Tap et Wong 1983 |
| <i>Alnus crispa</i> | 5,7-7,2 | 2-4 | 4 | 0-34 | Wang, don. in. |
| <i>A. rubra</i> | 5,3-8,5 | 2-4 | 4 | 0-13 | Wang, don. in. |
| <i>Araucaria cunninghamii</i> | 16-23 | -15 | 8 | peu | Shea et Armstrong 1978 |
| | 7 | 19 | 0,1 | 0 | Tompsett 1982 |
| <i>Betula alleghaniensis</i> | 8,5-13,2 9-14,3 | 2-4 -18 | 15 15-23 | 54-100 38-43 | Wang, don. in. Wang, don. in. |
| <i>Casuarina equisetifolia</i> | 16 | -3 | 2 | 0-5 | Jones 1967 |
| <i>C. torulosa</i> | 8-12 | 20-25 | 18 | 16 | Turnbull et Martensz 1982 |
| <i>Eucalyptus</i> spp. | 4-8 | 3-5 | 5-20 | - | Boland 1986 |
| <i>Larix decidua</i> | 7,5 | 2-4 | 14 | 27 | Wang, don. in. |
| <i>L. gmelini</i> | 6,2 | 2-4 | 15 | 5 | Wang, don. in. |
| <i>L. laricina</i> | 5,5-9,8 | 2-4 | 17-18 | 32-52 | Wang, don. in. |

TABLEAU 1 suite

| Espèces | Teneur en eau (% du poids frais) | Température de conservation (°C) | Durée de conservation (années) | Perte de viabilité (%) | Référence |
|---|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <i>L. leptolepis</i> | 12,1 | 2-4 | 23 | 66 | Wang, don. in. |
| <i>L. sibirica</i> | 6 | 2-4 | 13 | 0 | Wang, don. in. |
| <i>Liquidambar styraciflua</i> | 5-10 | 3 | 9 | 3 | Bonner 1987 |
| <i>Picea abies</i> | 5,4-9,8 | 2-4 | 21-27 | 9-83 | Wang, don. in. |
| <i>P. engelmannii</i> | 4,2 | 2-4 | 28 | 31 | Wang, don. in. |
| <i>P. glauca</i> | 3,6-5,5 | 2-4 | 17-20 | 0-14 | Wang, don. in. |
| | 6,4-7,9 | 2-4 | 20-24 | 1-68 | Wang, don. in. |
| | 8,5-9,0 | 2-4 | 21-34 | 47-81 | Wang, don. in. |
| <i>P. mariana</i> | 6,5-13,5 | 2-4 | 13-15 | 1-4 | Wang, don. in. |
| | 5,2 | 2-4 | 37 | 38 | Wang, don. in. |
| | 5,6-13,5 | -18 | 13 | 26-36 | Wang, don. in. |
| <i>P. rubens</i> | 8,8-9,1 | 2-4 | 23-30 | 0-2 | Wang, don. in. |
| <i>P. sitchensis</i> | 6,8-9,5 | 2-4 | 13-24 | 0-11 | Wang, don. in. |
| <i>Pinus banksiana</i> | 11,2 | 2-4 | 17-18 | 0-8 | Wang, don. in. |
| | 4,8-5,0 | 2-4 | 21 | 0-15 | Wang, don. in. |
| <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> | - | 8 | 2,7 | ± 16 | Yap et Wang 1983 |
| <i>P. contorta</i> var. <i>latifolia</i> | 3,6-4,8 | 2-4 | 29 | 52 | Wang, don. in. |
| | 9,2-10 | 2-4 | 20 | 1-3 | Wang, don. in. |
| <i>P. elliotii</i> | 10 | 4 | 50 | 30 | Barnett et Vozzo 1985 |
| <i>P. merkusii</i> | 8+ | 4-5 | 4 | 0 | Pousujja <i>et al.</i> 1986 |
| | 8 | 0 | 7 | 0 | Allen 1957 |
| <i>P. ponderosa</i> | 6,3 | 2-4 | 12 | 0 | Wang don. in. |
| | 5,4-9,1 | 2-4 | 13-20 | 0-3 | Wang don. in. |
| <i>P. resinosa</i> | 8,0-10,0 | 0-2 | 42 | 0 | Eliason et Heit 1973 |
| | 5,6-6,5 | 2-4 | 15-20 | 32-77 | Wang, don. in. |
| <i>P. strobus</i> | 8,0-8,7 | -18 | 15-20 | 0-18 | Wang, don. in. |
| | ± 12 | 0-4 | 7 | 0 | Keiding 1985 |
| <i>Tectona grandis</i> | ± 12 | 0-4 | 7 | 0 | Keiding 1985 |
| <i>Tsuga heterophylla</i> | 8 | 5-18 | 2 | 0 | Barton 1954 |

Certaines semences du type sous-orthodoxe sont extrêmement riches en lipides (*Juglans nigra* et certaines espèces de *Carya*) et d'autres sont petites avec une enveloppe mince (par exemple *Populus* sp., *Salix* sp.). Les semences de ce groupe peuvent être stockées dans les mêmes conditions que les semences du type orthodoxe véritable, mais seulement pendant de 0,6 à 6 ans. La perte de viabilité oscille entre 0 à 34% lorsqu'elles sont stockées à des températures variant entre -5° et -20°C et que leur teneur en eau se situe entre 5 et 10% (Bonner, 1990). Voir tableau 2.

TABLEAU 2.

Longévité de certaines espèces de semences du type sous-orthodoxe

| Espèces | Teneur en eau (% du poids frais) | Température de conservation (°C) | Durée de conservation (années) | Perte viabilité (%) | Référence |
|--|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| <i>Citrus limon</i> | 5 | -20 | 9,6 | ±5 | King <i>et al.</i> 1981 |
| <i>Fagus sylvatica</i> | 10 | -10 | 5 | 34 | Suszka 1975 |
| <i>Gmelina arborea</i> | 6-10 | -5 | 2 | 10 | Woessner et McNabb 1979 |
| <i>Malus domestica</i> cv. «Antonowka» | 6,7-8,9 | -1 à -18 | 3,1 | 0 | Grezeskowiak <i>et al.</i> 1983 |
| <i>Populus deltoides</i> | 6-10 | -20 | 6 | 21 | Tauer 1979 |
| <i>P. deltoides</i> var. <i>occidentalis</i> | 8,4-13,5 | -18 | 10 | 24-100 | Wang 1982 |
| <i>P. grandidentata</i> | 10,8-14,8 | -18 | 12 | 14-29 | Wang 1982 |
| <i>Prunus avium</i> | 8,9-10,4 | -1 à -3 | 2 | 0 | Grezeskowiak <i>et al.</i> 1983 |
| <i>P. cerasifera</i> var. <i>divaricata</i> | 7,6-11,9 | -1 à -3 | 2 | 0 | Grezeskowiak <i>et al.</i> 1983 |
| <i>Pyrus cancasia</i> | 8,6-10,5 | -1 à -18 | 3,1 | 0 | Grezeskowiak <i>et al.</i> 1983 |
| <i>Salix glauca</i> | 6-10 | -10 | 1,2 | 0 | Zasada 1977 |

Les semences du type récalcitrant des régions tempérées sont sensibles à la dessiccation mais peuvent être stockées à des températures avoisinant le point de congélation. Font partie de ce groupe *Acer saccharinum*, *Quercus* sp. et *Aesculus hippocastanum*. Elles peuvent être séchées jusqu'à atteindre une teneur en eau relativement élevée de 35 à 50% (poids frais) et stockées sans risque à des températures oscillant entre 3° et -3°C (Bonner, 1973; Suszka et Tylkowski, 1981, 1982). Les semences de ce groupe ont une longévité de 12 à 30 mois si l'on parvient à maintenir une teneur en eau relativement élevée et qu'il est possible de procéder à des échanges gazeux.

Les graines du type récalcitrant tropical sont généralement grosses et on les trouve surtout chez (a) les espèces d'arbres des forêts humides appartenant aux familles des diptérocarpacées et des araucariacées, (b) d'importantes essences tropicales cultivées telle que l'hévéa, le cacaoyer, et le cocotier, et (c) des essences fruitières tropicales comme le manguier, le mangoustier, le durion, le ramboutan, et le jaquier (Chin, 1988a). Les semences de ce groupe sont sensibles à la dessiccation et au froid, et beaucoup d'entre elles ne tolèrent pas les températures au-dessous du point de congélation (par ex. *Hevea brasiliensis* et *Nephelium lappaceum*). Certaines ne supportent pas des températures de 4°C (*Shorea roxburghii* (= *talura*)), voire de 15°C (*Theobroma cacao*) (Chin, 1988a).

D'après la plus récente revue bibliographique sur la conservation des semences de *Dipterocarpus* (Tompsett, 1987, 1989), la longévité de semences du type récalcitrant de 79 espèces tropicales variait de 14 jours, pour *Shorea dasyphylla*, à 365 jours pour *Hopea hainanensis*. Il est intéressant d'observer que, même si les semences du type récalcitrant tant tropicales que tempérées sont sensibles à la dessiccation et aux basses températures, les différences entre ces deux catégories semblent résider dans leur sensibilité relativement élevée aux basses températures et dans la longévité plus courte des semences des espèces tropicales. Il faut souligner que la longévité des semences des différentes catégories, tel qu'indiqué plus haut, est évaluée à partir de nos connaissances actuelles; elle pourrait varier d'un groupe à l'autre au fur et à mesure que les techniques de dessiccation et de conservation s'amélioreront.

FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Qualité initiale de la semence

Afin d'assurer aux semences conservées des différentes catégories la plus longue durée de vie possible, l'un des problèmes associés à la constitution de banques de gènes est la qualité initiale des semences au moment le stockage (Conseil international des ressources phytogénétiques, IBPGR, 1982). Toutes les semences récoltées de populations sélectionnées doivent être soumises à un contrôle rigoureux de leurs qualités génétiques et physiologiques originales pendant toute la durée des étapes de récolte, de manutention, de traitement, de test et de stockage. Les conséquences néfastes de la récolte de semences viables mais immatures sur leur viabilité en cours de stockage ont été abondamment décrites et expliquées (Wang, 1974). Par exemple, dans le cas des graines de type récalcitrant de *Shorea roxburghii* (= *talura*), les 3 dernières semaines qu'elles passent dans l'arbre sont essentielles pour leur permettre d'atteindre leur faculté germinative maximale (Sasaki, 1980). Même si Berjak *et al.* (1990) ont affirmé que les semences de type récalcitrant ne se dessèchent pas avant d'arriver à maturité, comme le font les semences de type orthodoxe, les résultats de recherches effectuées en Thaïlande semblent indiquer que c'est cependant le cas, du moins pour les semences de *Shorea siamensis*, dont la faculté germinative a crû lorsqu'on a réduit sa teneur en eau de 40 à 30 % (Panochit *et al.*, 1986). Dans une étude parallèle, Panochit *et al.* (1984) ont découvert que la faculté germinative des semences de *Shorea roxburghii* (= *talura*) passait de 33 à 92% lorsque la teneur en eau diminuait de 59 à 49%.

La qualité initiale des semences dépend également de leur postmaturation. Des recherches récentes tendent à démontrer que la postmaturation est importante pour la faculté germinative de *Picea glauca* (Caron *et al.*, 1989, 1993) ainsi que pour la faculté germinative, la vitalité et le bon comportement en stockage des semences de *Pinus palustris*, *P. strobus*, et *P. taeda* (Bonner, 1991). Les exigences des semences de type récalcitrant en matière de postmaturation ont été décrites pour la première fois par Tang et Tamari (1973) pour les semences d'*Hopea helferi* et de *H. odorata*. Panochit *et al.* (1986) ont découvert que la germination de semences immatures de *Shorea roxburghii* (= *taluta*) augmentait lorsque

leur teneur en eau était réduite de 40 à 30% sur une période de 4 jours. En ce qui concerne le traitement des semences, on a découvert récemment que si on exposait dans un four pendant une longue période des semences de *Pinus contorta* à une température de 60°C, cela pouvait inhiber leur vitalité à cause des dommages causés au tégument (Wang *et al.*, 1992).

Étant donné que la dormance des semences est reconnue comme un facteur important de la longévité de la graine entreposée, il est essentiel de protéger son enveloppe et ses autres composantes physiques et physiologiques qui influent sur la dormance (Barton, 1961; Harrington, 1972). De nouvelles techniques de traitement des graines dormantes chez le hêtre, le frêne et le merisier se montrent prometteuses (Muller, Bonnet-Masimbert et Laroppe, 1990). L'importance de la qualité initiale de la semence pour sa longévité lors de conservation a été démontrée par son inclusion, en tant que facteur important, dans les formules mathématiques de viabilité élaborées par Roberts (1972) et Ellis et Roberts (1980), où le pourcentage de viabilité d'une population de semences dépend de la température de stockage, de la teneur en eau et de la qualité initiale de la semence. Tompsett (1986, 1989) a appliqué avec succès ces formules de viabilité à des semences d'arbres tropicaux, celles d'*Araucaria columnaris*, *Dipterocarpus alatus*, *Entandrophragma angolense*, *Swietenia humilis*, *Terminalia brassii*, et *Ulmus carpinifolia*, et a prouvé que la longévité des graines dépendait étroitement de la qualité initiale de la semence.

Teneur en eau des graines

La teneur en eau des graines, la température à laquelle elles sont entreposées et la présence d'oxygène sont trois facteurs essentiels qui influent sur la longévité des semences entreposées. Roberts et Ellis (1989) ont découvert que la teneur en eau avait (a) peu ou pas d'effet sur la longévité aux faibles niveaux (1,5 - 2,5%) où l'on est susceptible de stocker des semences du type orthodoxe véritable, (b) un effet néfaste sur la longévité dans les cas de teneurs en eau moyennes (2,6-14,7%) où la plupart des semences du type orthodoxe véritable et sous-orthodoxe sont stockées à long terme, où la présence d'oxygène nuit à la longévité, et (c) un effet catastrophique en présence d'oxygène dans les cas où les

semences a forte teneur en eau (15-45%) sont conservées (semences de type récalcitrant tant tropicales que tempérées).

Pour la conservation à long terme des propriétés génétiques des semences tant de type orthodoxe véritable que sous-orthodoxe, on a recommandé que la teneur en eau soit réduite à $5 \pm 1\%$ (Conseil international des ressources phytogénétiques, IBPGR, 1976). Cette norme a été contestée par Cheng *et al.* (1990), qui ont prouvé que la teneur en eau des graines de *Brassica pekinensis* pouvait être réduite de 8,6% à 1,6% par lyophilisation et qui considéraient ce type de conservation dans des conditions de sécheresse extrême comme potentiellement utile et rentable pour la conservation à long terme du plasma germinatif.

Dans le cas des semences de la plupart des espèces ligneuses du type orthodoxe véritable et sous-orthodoxe, la teneur en eau est habituellement ramenée à moins de 10% (du poids frais) à des températures de 20° à 35°C pour conservation à court ou à moyen terme. Dans le cas de la conservation à long terme des gènes, on peut être obligé de diminuer encore la teneur en eau à $5 \pm 1\%$ ou moins (Conseil international des ressources phytogénétiques, IBPGR, 1976). Pour obtenir ce pourcentage de teneur en eau, Cromarty *et al.* (1982) recommandent d'utiliser un séchoir où l'on maintient une température contrôlée de 15°C et une humidité relative de 10 à 15%, ou un système de dessiccation en deux stades. On peut obtenir par lyophilisation une teneur en eau inférieure (moins de 5%) dans le cas des semences d'arbres du type orthodoxe, mais il faut déterminer pour les espèces en question la teneur en eau critique initiale. Suber *et al.* (1973) ont réussi à réduire la teneur en eau des graines de *Picea abies* de 8 à 2,4% (du poids frais) par lyophilisation sans leur causer de dommage et, par la suite, ont stocké les graines à une température de 25°C pendant 6 ans, leur faculté germinative se trouvant réduite de 9% après cette période.

Par ailleurs, les semences du type récalcitrant ne peuvent être déshydratées en deçà d'une teneur en eau relativement élevée; leur longévité augmente en proportion de leur teneur en eau en présence d'oxygène (King et Roberts, 1979). Afin de prolonger la longévité des

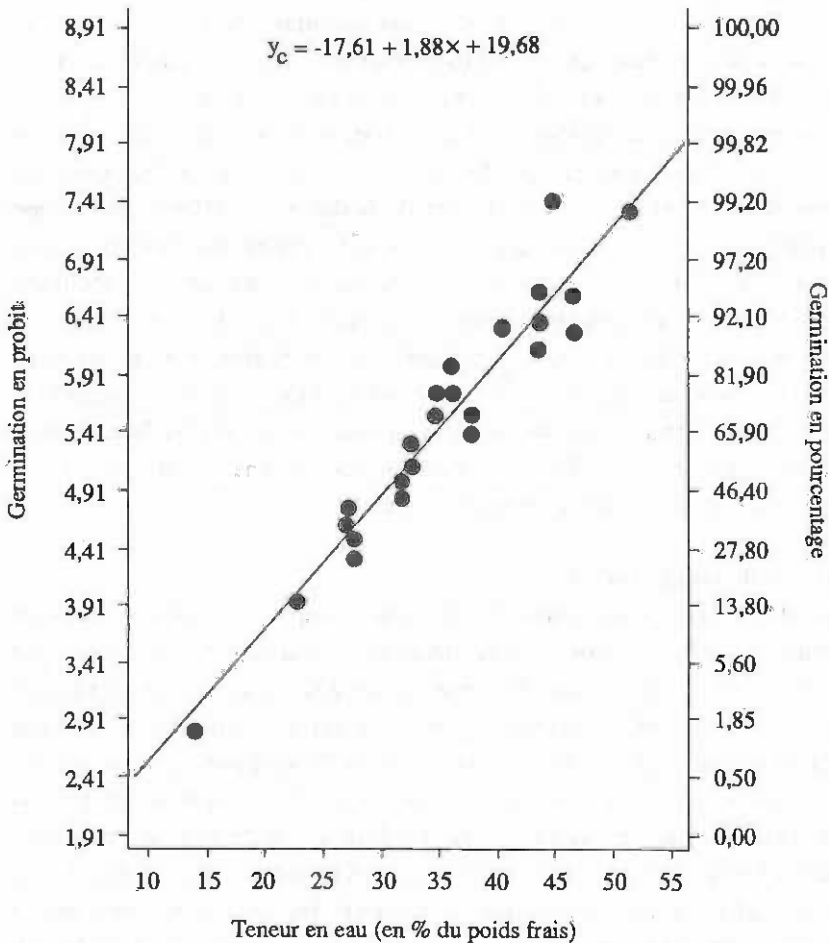
semences du type récalcitrant tant tempérées que tropicales, l'une des méthodes préconisées par King et Roberts (1979) consiste à étudier les conditions de dessiccation et les taux de dessiccation. Le rapport entre la teneur en eau de la graine d'*Acer saccharinum* et sa faculté germinative au cours d'une période de 30 jours est indiquée dans la Figure 1 (Wang *et al.*, 1991, données inédites). Berjak *et al.* (1990) ont utilisé une technique de séchage instantané, utilisant un jet d'air comprimé projeté entre deux colonnes de gel de silice activé, et ont réduit avec succès la teneur en eau des axes embryonnaires du type récalcitrant de *Landolphia kirkii* de 49% à 16% (du poids sec) sans en diminuer la viabilité ni la vitalité.

En cas du séchage à l'air, il faut souligner que, puisque les graines n'ont pas la même composition chimique, des semences d'essences différentes exposées aux mêmes températures et taux d'humidité relative n'atteindront pas la même teneur en eau d'équilibre (Harrington, 1972). Par exemple, soumis à une température de 4° à 5°C à un taux d'humidité relative de 95%, les glands amylicés de *Quercus alba* ont atteint une teneur en eau d'équilibre de 50%, tandis que celle des glands riches en lipides de *Quercus nigra* atteignait 29% (poids frais). Cela s'est produit parce que l'amidon est plus hygroscopique que les matières grasses (Bonner et Vozzo, 1987).

Wang (1974) a analysé la teneur en eau critique de différentes espèces, au-dessus et au-dessous de laquelle on constate une diminution rapide de la faculté germinative de la graine, et considère ces données comme utiles à un stockage dans de bonnes conditions. Une expression comme «la valeur minimale de sécurité de teneur en eau» (en anglais "lowest safe moisture content, LSMC) a été utilisée par Tompsett (1987) dans le cas des graines de *Dipterocarpus*. Stanwood (1985) s'est servi du concept de "limite supérieure de teneur en eau pour la congélation" (en anglais "high moisture freezing limit, HMFL), pour assurer un stockage par cryopréservation ne causant pas de brûlures par le gel. Un résumé des proportions de LSMC déterminées selon les résultats publiés pour les graines de *Dipterocarpus* est présenté par Tompsett (1987).

FIGURE 1.

Relations quantitatives entre la teneur en eau en pourcentage du poids frais et la faculté germinative, exprimée en pourcentage et en probit, de semences d'érable argenté (*Acer saccharinum*) et séchées à l'air à température et humidité relative ambiantes dans un abri conique pendant 30 jours (Wang, Saelim et Downie, 1991, données inédites)



Température de conservation

La température de conservation est l'autre grand facteur influençant la longévité des graines. L'importance de cette température pour le maintien de la viabilité des semences d'espèces ligneuses a été bien étudiée (Holmes et Buszewicz, 1958; Barton, 1961; Heit, 1967a, b; Wang, 1974; King et Roberts, 1979, 1980; Stanwood, 1985; Tompsett, 1989; Bonner, 1990). En général, il a été recommandé que pour la conservation à long terme de semences du type orthodoxe d'espèces ligneuses pour la conservation des gènes on abaisse leur teneur en eau à 1-5% (du poids frais) et qu'on les conserve dans des récipients fermés hermétiquement à -18°C (Conseil international des ressources phytogénétiques, 1976; Roberts et Ellis, 1977). Toutefois, il y a toujours des risques de détérioration des graines et de diminution de la viabilité à une température aussi basse, conservation entraînant, s'il se prolonge, une disparition de matériel génétique précieux (Stanwood, 1985). D'après un article de Diskie *et al.* (1990), la relation entre la longévité relative des graines et la température donne à penser que plus la température de stockage est basse, plus les graines stockées peuvent être conservées longtemps. Cette relation semble indiquer que la cryopréservation est un mode privilégié de conservation à long terme de matériel génétique précieux. À ces températures de cryoconservation (de -145° à -196°C), tout métabolisme est suspendu (Stanwood et Bass, 1981; Withers, 1990c). Les effets du froid sur les semences sont décrits en détails aussi chez Côme et Corbineau (1992).

Méthode de conservation

La méthode de conservation des graines d'espèces données varie en fonction de leur comportement. Dans le cas des semences du type orthodoxe et sous-orthodoxe, la conservation à sec est recommandée dans des récipients fermés hermétiquement, où ne s'effectue pratiquement aucun échange d'air (Wang, 1974). Cette technique permettra maintenir une teneur en eau constante dans les graines, de réduire la respiration, la quantité de gaz carbonique augmentant et la quantité d'oxygène diminuant, et de protéger les graines des insectes et des maladies (Harrington, 1972; Wang, 1974). Dans une étude comparant les effets d'atmosphères confinées composées d'air, de gaz carbonique ou d'azote, et de vide, sur la faculté germinative de semences de *Pinus radiata* stockées avec une

teneur en eau de 8% (du poids frais) à une température de 5° à 35°C pendant un an, on a découvert que la germination, l'énergie et la vitalité des semis se maintenaient davantage si on les entreposaient dans l'azote. Suivaient le gaz carbonique, le vide et l'air, quelle que soit la température de stockage (Shrestha *et al.*, 1985). Cependant, conservation de semences du type orthodoxe non desséchées présente un certain nombre d'avantages selon Villiers (1974), et Villiers et d'Edgecombe (1975). Ainsi, les mécanismes de réparation des enzymes, des membranes cellulaires et de l'ADN demeurent tous intacts, éliminant les dommages dès qu'ils se produisent, et l'intégrité de la membrane assure une bonne compartimentation des enzymes et des processus métaboliques.

Les semences à comportement récalcitrant exigent une teneur en eau relativement élevée, et un stockage hermétique prolongé les détériorera (Wang, 1974). En général, le stockage le plus réussi est le résultat de méthodes limitant la dessiccation, la contamination microbienne et la germination en cours de stockage, pourvu que l'alimentation en oxygène soit adéquate (King et Roberts, 1980). La conservation dans des milieux humides tels que la tourbe, la sciure de bois ou le sable a donné de bons résultats pour les semences de chêne (Korstian, 1930; Gardener, 1939), d'*Aleurites fordii* (Large *et al.*, 1947), d'hévéa (Ang, 1976), de *Castanea* sp. (Texeira, 1955; Jaynes, 1969), de caféier (Leon, 1974), de *Citrus* sp. (Honjo et Nakagawa, 1978), de ramboutan (Chin, 1975) et de cacaoyer (Evans, 1953). Tel que l'ont signalé King et Roberts (1980b), le stockage en milieu humide n'est adéquat que pour quelques mois et n'est vraisemblablement pas efficace à long terme. Jusqu'ici, la méthode la plus efficace de conservation des graines du type récalcitrant est la conservation dans des sacs de polyéthylène fermés hermétiquement. Des glands de type récalcitrant de chênes des régions tempérées ont été stockés avec succès avec une teneur en eau de 30% (poids frais) dans des sacs de polyéthylène d'une épaisseur de 4 à 10 millièmes de pouce, entre +3° et -3°C pendant des périodes pouvant aller jusqu'à 5 ans (Bonner et Vozzo, 1987). On a rapporté une durée de stockage des glands plus grande dans des atmosphères comportant davantage de gaz carbonique (Vozzo, 1976; Tylkowski 1976). Une méthode prometteuse actuellement utilisée pour stocker des semences tropicales du type récalcitrant consiste à sécher

partiellement les semences pendant quelques heures, à les traiter avec un fongicide, à les placer dans des sacs en polyéthylène minces fermés hermétiquement et à les stocker à une température d'environ 15°C (par ex. cacaoyer, *Dryobalanops aromatica*, *Hopea helferi*, *H. odorata*) (King et Roberts, 1980a). Une thermothérapie sans traitement chimique s'est avérée également efficace pour certaines semences en état de dormance, telle que celle du chêne pédonculé (*Quercus robur*) (Muller, 1990).

CRYOPRÉSERVATION

La cryopréservation désigne généralement le recours à des températures extrêmement basses (-80° à -196°C) pour préserver des matières biologiques (Towill, 1985); dans le présent texte, le terme s'applique à la préservation des graines. Comme l'a signalé Stanwood (1985), il n'a pas été démontré que la préservation physiologique de semences à des températures allant de -40° à -196°C était notablement supérieure à celle qui était obtenue à -20°C. Cependant, des estimations de la longévité à partir de l'équation sur la viabilité (Ellis et Roberts, 1980) donnent à croire que plus la température de stockage est basse, plus la durée potentielle de le stockage est longue (Stanwood, 1985; Dickie *et al.*, 1990). Les avantages potentiels de la cryopréservation par rapport aux techniques conventionnelles sont l'absence de contrôles compliqués de la température et de l'humidité, l'absence de dommages dus aux insectes et aux maladies, et une longévité indéfinie à peu près sans dommage génétique (Styles *et al.*, 1982).

Toutes les sortes de semences ne peuvent être entreposées à des températures cryogéniques en raison des différences dans la composition chimique et la physiologie en cours de stockage. Il est donc essentiel d'examiner les divers facteurs influençant la réussite de la cryopréservation des semences. Stanwood (1985) préfère l'azote liquide aux systèmes de réfrigération mécanique comme milieu de cryopréservation car il est relativement fiable et facile à utiliser. Il a groupé les semences de différentes espèces en trois catégories selon leur réaction à l'exposition à l'azote liquide : (1) tolérant à la dessiccation et tolérant à l'azote liquide, (2) tolérant à la dessiccation et sensible à l'azote liquide, (3) sensible à la dessiccation et sensible à l'azote liquide.

La cryopréservation a été reconnue comme l'approche la plus prometteuse de conservation de semences du type récalcitrant (Roberts *et al.*, 1984; King et Roberts, 1979, 1980; Bonner, 1990), et d'importants progrès ont été réalisés dans l'élaboration de techniques de conservation nouvelles et améliorées (Chin, 1988a; King et Roberts, 1979, 1980a; Farrant *et al.*, 1988). Dans le rapport d'étape le plus récent sur les semences à comportement récalcitrant, Chin (1988a) affirmait que jusqu'ici il n'a pas eu de succès avec les semences du type récalcitrant véritable et soulignait l'importance de la mise au point de techniques de cryostockage pour les embryons excisés d'essences du type récalcitrant.

Semences tolérantes à la dessiccation et à l'azote liquide

Dans cette catégorie figurent les semences des espèces agricoles et horticoles les plus courantes, des conifères et des feuillus à petites graines, qui peuvent généralement être caractérisées, par leur comportement pendant le stockage, comme étant des semences du type orthodoxe véritable ou sous-orthodoxe. On a obtenu de remarquables succès en refroidissant ce type de semences dans de l'azote liquide à une température de -196°C et en les faisant revenir à une température ambiante de 20°C sans diminution de la viabilité (Stanwood, 1985). Le tableau 3 donne la liste de ces semences (voir Stanwood et Bass, 1981; Stanwood, 1985; Bajaj, 1976; Brown et Escombe, 1897; Wang et Hay, 1989, données inédites), qui sont toutes du type orthodoxe véritable.

Pour que la cryopréservation soit réussie, une échelle de teneur en eau optimale est fondamentale pour la méthode de refroidissement et de réchauffement. Stanwood (1985) a défini une limite pour la congélation des graines à teneur élevée en eau (LCGTEA), qui est le seuil de teneur en eau au-delà duquel se produit une perte de viabilité lors du processus de refroidissement/réchauffement. Cette limite est généralement une étroite échelle de teneur en eau pour une espèce donnée, mais elle varie selon les espèces (Stanwood, 1985). Pour le dattier (*Phoenix dactylifera*), la limite a été établie à entre 16,1 et 22,3% (poids frais) : Tompsett (1986) a fait état, pour les semences d'*Ulmus carpinifolia* et de *Terminalia brassii*, de LCGTEA respectives de 19-22% et 17-20% (poids frais) lorsqu'elles ont été stockées pendant une semaine à -75°C .

TABLEAU 3.

Semences de certaines espèces d'arbres tolérant le stockage dans l'azote liquide

| Espèces | Teneur en eau (% du poids frais) | Durée de conservation (jours) | Perte de viabilité (%) | Référence |
|---|----------------------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>Abies alba</i> | - | 6 | 5 | Ahuia, 1986 |
| <i>Abies concolor</i> | 9,8 | 365 | 9 | Stanwood, 1985 |
| <i>A. procera</i> | 8,9-10,1 | 365-1095 | 1-12 | Stanwood, 1985 |
| <i>Fagus sylvatica</i> | - | 6 | 100 | Ahuia, 1986 |
| <i>Larix decidua</i> | - | 6 | 5 | Ahuia, 1986 |
| <i>Picea abies</i> | - | 6 | - | Ahuia, 1986 |
| <i>P. glauca</i> | 3,8-6,7 14 | 4 14 | 0 30 | Wang et Hay, don. in. |
| <i>P. mariana</i> | 4,8-6,7 | 14 | 2 | Wang, don. in. |
| <i>Pinus banksiana</i> | 6-8 | 14 | 10 | Wang, don. in. |
| <i>P. contorta</i> var. <i>latifolia</i> | 11 | 14 | 4 | Wang, don. in. |
| <i>P. echinata</i> | - | 112 | 0 | Engstrom, 1966 |
| <i>P. lambertiana</i> | 6,6 | 365 | 10 | Stanwood, 1985 |
| <i>P. ponderosa</i> | 4,7 | 1095 | 0 | Stanwood, 1985 |
| <i>Populus tremula</i> x <i>P. tremuloides</i> | - | 6 | 1 | Ahuia, 1986 |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i> | 6,8 | 1095 | 0 | Stanwood, 1985 |
| <i>Thuja plicata</i> | 7,0 | 1095 | 1 | Stanwood, 1985 |
| <i>Tsuga heterophylla</i> | 8,2 | 1095 | 0 | Stanwood, 1985 |
| <i>Ulmus americana</i> | 6,4 | 1095 | 7 | Stanwood, 1985 |
| <i>U. pumila</i> | - | 112 | 0 | Engstrom, 1966 |

Des semences d'*Abies*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Thuja*, *Tsuga* et *Ulmus* sp. ont été cryopréservées avec succès dans de l'azote liquide pendant 1 à 3 ans, avec un refroidissement à vitesse non contrôlée et un rythme de réchauffement de 30°C/min., mais des semences de *Picea glauca* et de *P. mariana* ont été stockées avec succès dans de l'azote liquide pendant 4 jours sans contrôle de la vitesse de refroidissement ou de décongélation (Wang et Hay, données inédites). Bien que la vitesse de refroidissement et de réchauffement ne soit pas considérée comme importante, chaque espèce devrait être testée afin d'éviter toute diminution de la viabilité.

Les produits chimiques cryoprotecteurs contribuent parfois à amoindrir les dommages que subissent les graines au cours de la congélation en diminuant la vitesse de refroidissement et/ou la température où les cellules gèlent (Kausrin et Stushnoff, 1985). Il existe un bon nombre de substances cryoprotectrices. Les plus populaires sont le diméthylsulfoxyde (DMSO), le propane-1,2-diol et le glycérol (DeBoucaud et Cambecedes, 1988). Le DMSO est le cryoprotecteur le plus généralement utilisé, mais il a tendance à être toxique, qu'il soit utilisé seul en solution aqueuse (Kausrin et Stushnoff, 1985) ou mélangé à d'autres produits chimiques (Gazeau, 1980). Cependant, ses effets bénéfiques l'emportent généralement sur l'effet toxique que l'on observe particulièrement quand il n'est pas ultrapur (L.A. Withers, communication personnelle).

Les transformations physiques provoquées dans les semences par le stockage dans de l'azote liquide peuvent être bénéfiques, neutres ou nocives. Les effets bénéfiques peuvent être attribuables à une augmentation de la perméabilité en raison d'une légère fente dans l'enveloppe. Si la transformation est nocive, il y a difformité ou mort des graines. Ce dommage peut être directement relié à la congélation dans de l'azote liquide, par exemple quand des taux différentiels de contraction/expansion des tissus font que les cotylédons se détachent de leurs pétioles (Pritchard *et al.*, 1988). L'altération peut aussi être causée indirectement par les dommages subis lorsque le taux accru d'inhibition à travers une enveloppe plus perméable détériore les graines sensibles au

stress d'inhibition (Spaeth, 1986). Wang et Hay (données inédites), travaillant sur *Picea mariana* et *Picea glauca*, ont découvert que l'immersion directe des graines dans de l'azote liquide a entraîné l'enlèvement complet de l'enveloppe d'environ 1% des graines des deux espèces.

L'exposition à des températures cryogéniques de -150°C ou moins est non seulement tolérée, mais entraîne la disparition de la dureté des graines de *Lotus corniculatus* (lotus corniculé, ou trèfle cornu) et de plusieurs autres espèces (Pritchard *et al.*, 1988). Il est peut-être possible d'appliquer cette technique pour lever la dormance de l'enveloppe de nombreuses légumineuses tropicales. Parmi les espèces testées (plus de 150), seules quelques-unes ont subi des dommages dus au refroidissement et au réchauffement subséquent ailleurs qu'à la surface de l'enveloppe (Stanwood, 1985). Dans le cas des espèces ayant subi des dommages physiques, on devrait examiner la possibilité de vitesses de refroidissement plus lentes et/ou d'une congélation par étapes pour atténuer les problèmes.

Semences tolérantes à la dessiccation et sensibles à l'azote liquide

Parmi les semences de cette catégorie figurent un grand nombre d'essences fruitières et d'essences portant des fruits à écale, par exemple des espèces de *Corylus*, *Juglans* et *Prunus*, ainsi que des arbres forestiers tels que *Fagus silvatica*, *Gmelina arborea* et *Populus* sp. Elles se caractérisent par une tolérance à la dessiccation à une teneur en eau inférieure à 10% (du poids frais) et par une durée de stockage possible de moins de 5 ans (Stanwood, 1985). Elles sont cependant sensibles aux températures inférieures à -40°C . Ces semences sont en général riches en lipides de réserve, jusqu'à 60-70% chez certaines espèces (Bewley et Black, 1983). Des semences d'espèces de *Corylus* ont perdu leur viabilité à des températures inférieures à -40°C , apparemment à cause de la solidification des huiles (Stanwood, 1985). Cependant, la toxicité de l'azote liquide, particulièrement lorsqu'il n'est pas ultrapur, est généralement contrebalancée par ses effets bénéfiques (L. Withers, communication personnelle). Des recherches récentes font état d'une bonne survie et d'une croissance normale d'axes embryonnaires cryopréservés de *Juglans* (Pence, 1990; de Boucand *et al.*, 1991), de *Carya* et de *Corylus* (Pence, 1990), d'*Aesculus hippocastanum* (Pence,

1992) et de *Quercus* (Gonzalez-Benito et Perez-Ruiz, 1992; Jorgensen, 1990). De nouvelles recherches seront nécessaires pour mettre au point des milieux optimums pour la croissance d'axes embryonnaires isolés récupérant après dessiccation et congélation pour donner des plantes saines (Pence, 1990).

Semences sensibles à la dessiccation et à l'azote liquide

Dans cette catégorie figurent des semences à comportement récalcitrant tant tempérées que tropicales, dont celles de nombreuses espèces cultivées telles que l'hévéa (*Hevea brasiliensis*), l'aréquier, le palmier et le cacaoyer (*Theobroma cacao*), des essences fruitières tropicales telles que le mangouier (*Mangifera indica*), le jacquier (*Artocarpus heterophyllus*) et le ramboutan (*Nephelium lappaceum*) et des essences de bois d'oeuvre des familles des diptérocarpacées et des araucariacées (Chin, 1988a). Ces semences sont caractérisées par leur grande taille, leur vie brève et leur sensibilité à la dessiccation et aux températures inférieures au point de congélation (Chin, 1988a). On avait déjà déterminé que les semences de certaines espèces de cette catégorie étaient du type récalcitrant, mais on sait maintenant qu'elles sont tolérantes à la fois à la dessiccation et à l'exposition à l'azote liquide (par ex. grenadille, plantes à caoutchouc de Pará et de Ceará, goyavier commun, papayer) (Stanwood, 1985).

Il existe deux techniques principales le stockage des semences de type récalcitrant par cryogénie; soit qu'on excise, sèche et stocke les embryons dans de l'azote liquide, soit qu'on se serve de la graine entière (De Boucaud et Cambecedes, 1988). Une troisième méthode, introduite par Grout (1979), consiste à utiliser des semences de tomate non desséchées comme modèle pour stocker des semences à comportement récalcitrant dans de l'azote liquide. Les semences à teneur en eau de plus de 70% (du poids frais) conservées dans de l'azote liquide n'ont pas germé, mais les explants de méristème de pousse excisés de ces graines ont été viables après stockage et ont produit des clones par culture de tissus. L'emploi de cette technique exige cependant (a) que certains tissus somatiques de la graine en question demeurent viables après stockage dans de l'azote liquide et (b) que des techniques de culture de tissus soient maîtrisés pour l'espèce.

Grout *et al.* (1983) ont signalé que conservation de grosses semences du type récalcitrant d'essences ligneuses telles que l'hévéa, le cacaoyer, le cocotier et le palmier à huile pouvait exiger beaucoup d'espace si l'on entreposait toute la semence, ce qui accroît le coût de la cryopréservation. Donc, le stockage de plasma germinatif sous diverses formes (par ex. axes embryonnaires excisés, suspensions cellulaires, cals de culture de tissus, etc.) peut également être plus économique que le stockage de la semence entière.

Le principal problème lié au stockage de graines du type récalcitrant est leur sensibilité à la dessiccation. Le recours à des températures sous le point de congélation cause un gel intracellulaire et la mort. (Fu, 1951; Harrington, 1972; Sasaki, 1976; Chin, 1978). On ne sait pas si ces dommages mortels dus à la dessiccation se produisent rapidement à la teneur en eau critique, ou en dessous, ou si la perte de viabilité est graduelle, attribuable à une détérioration physiologique se produisant lorsque la teneur en eau est faible (King et Roberts, 1979). Il est aussi possible que la réduction de la teneur en eau cause des dommages à la membrane, ce qui a des conséquences sur la fonction membranaire et l'intégrité de l'organelle, conséquences qui se manifestent dans les cas extrêmes par une désintégration du noyau. Cela a été démontré pour des semences d'hévéa séchées au soleil (Chin *et al.*, 1981). Meryman et Williams (1985) ont cité des textes sur des plantes très diverses dont les cellules hydratées ont survécu à la perte de 55-57% d'eau cellulaire avant que ne se produisent des dommages irréversibles. On émet l'hypothèse que les dommages sont dus soit à la perte de l'intégrité de la membrane et à la pénétration de glace extracellulaire dans la cellule, soit à la perte irrécupérable de matière membranaire entraînant la rupture de la membrane cellulaire après réhydratation.

Mumford et Grant (1979) ont découvert que les graines de citronnier fraîches à teneur en eau de 90,1% (poids sec) ne pouvaient être stockées dans de l'azote liquide sans perdre toute viabilité. Le séchage de graines intactes de cette essence a produit une diminution de viabilité de 75% (à une teneur en eau de 90%) à 30% (teneur en eau d'environ 35%). Le stockage subséquent des graines séchées dans de l'azote liquide n'a pas

eu de conséquences sur la viabilité. Cependant, après avoir enlevé le testa des graines, il a été possible de sécher celles-ci pour atteindre une teneur en eau de 1,2% (du poids sec) sans diminution de la viabilité, tout en maintenant un taux de germination de 95%. Ces semences ont survécu à conservation dans de l'azote liquide, mais certaines n'ont pas réussi à produire de radicules une fois réchauffées. Pritchard et Prendergast (1986) et Grant *et al.* (1983) ont découvert que si les embryons d'*Araucaria hunsteinii* et de palmier à huile (*Elaeisis guinensis*), espèces du type récalcitrant, étaient excisés et séchés pour atteindre une teneur en eau de 20%, ils survivaient à conservation dans de l'azote liquide et croissaient par la suite *in vitro*. La stérilisation superficielle des embryons avant leur cryopréservation a réduit la survie des méristèmes de racine. Grant *et al.* (1983) ont découvert que les embryons excisés du palmier à huile avaient une teneur en eau de 48,3% et pouvaient être séchés avec succès pour atteindre une teneur de 20% sans que la viabilité soit réduite d'aucune façon (88% de germination). Toutefois, un séchage ultérieur réduisant la teneur en eau à 10,4% a été accompagné d'une légère réduction à 75% de la germination *in vitro*.

Ces embryons séchés ont pu être congelés et entreposés dans de l'azote liquide pendant au moins 8 mois sans que s'accroisse la perte de viabilité. D'après Chin (1988b), les espèces qui n'ont pas survécu à le stockage dans de l'azote liquide ont subi par la suite un test avec des cryoprotecteurs tels que le DMSO, le glycérol, le L-proline et divers milieux enrichis. Pour le moment, des embryons d'*Artocarpus heterophyllus*, *Nephelium lappaceum*, *Cocos nucifera* et *Dryobalans aromatica* ont survécu à la cryopréservation et ont repoussé dans des milieux enrichis. Ces techniques pourraient être utiles pour accroître la durée de le stockage d'autres espèces à comportement récalcitrant, mais des améliorations seront nécessaires.

À la suite d'une étude de la stratégie d'éventuelles recherches sur le stockage de semences du type récalcitrant, King et Roberts (1980b) se sont penchés sur la praticabilité de le stockage à long terme à basse température de semences de ce type. Ils ont suggéré trois approches pour tenter d'augmenter la période de le stockage des semences à

comportement récalcitrant : (1) identifier les espèces à semences du type récalcitrant véritable; (2) examiner les taux de séchage et les taux de germination subséquents, en accordant une attention particulière aux techniques de séchage sans air chauffé; (3) tenter d'améliorer les techniques traditionnelles de stockage des semences humides à des températures ambiantes ou sous-ambiantes si l'approche (2) s'avère impossible.

AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE LA CONSERVATION DES SEMENCES

En raison de la production irrégulière de semences chez les espèces ligneuses, en particulier les arbres forestiers, le stockage est essentiel dans le cas de programmes de boisement pour qu'il y ait production continue de semis. On pourrait avoir recours à le stockage des semences à basse température et à faible humidité pour faciliter et compléter d'autres stratégies de conservation des ressources génétiques (Hawkes, 1980; Bonner, 1990). En fait, sur la foi des connaissances actuelles sur le comportement des graines entreposées et la technologie de conservation, il peut être avantageux à plusieurs égards d'inclure le stockage de graines dans les systèmes de conservation et de régénération du plasma germinatif pour la conservation génétique à long terme des espèces d'arbres. Par exemple:

1. Les semences du type orthodoxe véritable d'essences d'arbres importantes peuvent être séchées pour atteindre une teneur en eau faible et stockées dans de l'azote liquide pendant une période indéfinie au-delà de l'âge de rotation avec peu ou pas de mutation génétique.
2. Par rapport à d'autres modes de conservation, le stockage des semences est d'un bon rapport rendement-prix et permet de préserver les trois types de diversité — clinale (géographique), entre populations et à l'intérieur de populations.
3. On trouve de bonnes installations de stockage partout dans le monde, ce qui peut contribuer à des échanges internationaux importants de plasma germinatif précieux.

4. Le stockage de semences peut servir d'une banque de gènes à court terme pour les espèces du type récalcitrant, à moyen terme pour les espèces du type sous-orthodoxe, et pour les espèces du type orthodoxe véritable aussi il peut servir d'un complément dans des stratégies de conservation génétique à long terme.

Cependant, il ne faudrait pas négliger les inconvénients de le stockage de semences pour la conservation génétique à long terme. Par exemple:

1. Les graines de nombreux arbres, en particulier celles d'espèces fort importantes du type récalcitrant tropical et récalcitrant tempéré, ne peuvent être stockées avec succès à l'aide des techniques actuelles.
2. Les semences volumineuses de certaines espèces ligneuses, particulièrement d'espèces à comportement récalcitrant telles que le cacaoyer, le jacquier et le manguier, occupent beaucoup d'espace, ce qui accroît le coût de la gestion des banques de semences.
3. Des inquiétudes ont été manifestées quant aux dangers potentiels de mutations génétiques provoquées par le vieillissement chez les graines stockées et les plantes auxquelles elles donneront naissance (Roos, 1982). Bien que les recherches semblent démontrer que les mutations chromosomiques et non chromosomiques sont éliminées en grande partie au cours du processus sexuel et ne sont donc pas transmises à la génération suivante, le Conseil international des ressources phytogénétiques (IBPGR, 1976) recommande, en guise de précaution, de régénérer le plasma germinatif stocké lorsque la faculté germinative baisse de 5-10%. Cela rendra nécessaire de reconstituer plus souvent les stocks de plasma germinatif, ce qui entraînera une augmentation des coûts.
4. Contrairement à celles des espèces agricoles, les semences des espèces ligneuses pérennes exigent de longs cycles de régénération (de 15 à 80 ans selon les espèces), du semis des graines à la maturité sexuelle, cycles qui sont en fait plus longs que les cycles de stockage (Hawkes, 1980). La régénération des lots de semences posera donc parfois un problème insurmontable.

Chapitre III

CONSERVATION *EX SITU* DE POLLEN

INTRODUCTION

Si possible, il est préférable de se servir de graines plutôt que de pollen comme véhicule de conservation génétique. Le stockage de pollen pour la conservation *ex situ* des allèles est important lorsque l'on stocke des espèces difficiles à conserver par d'autres méthodes *ex situ*, par exemple celles qui ont des semences du type récalcitrant et qui réagissent mal aux méthodes de culture de tissus. La faculté germinative du pollen frais, ou de celui qui est entreposé pour une brève période, est surtout déterminée par l'intégrité de la membrane de la cellule végétative (Shivanna et Heslop-Harrison, 1981; Hoekstra et van der Wal, 1988). L'état de cette membrane influencé par la manipulation du pollen et de l'eau qu'il contient à la fois avant et pendant le stockage. Le stockage à long terme accroît le risque que d'autres facteurs, par exemple la diminution de l'activité des enzymes, la réduction des réserves stockées, etc., entraînent la diminution de la faculté germinative (Stanley et Linskens, 1974). Les facteurs importants qui déterminent la longévité du pollen stocké sont, de l'avis général, la teneur en eau et la température (Towill, 1985). Ces deux paramètres influent sur la viabilité du pollen stocké à court et à long terme et déterminent donc quelle proportion des allèles de la population d'origine a été transmise à la génération suivante. Ce sont par conséquent des contraintes de nature physiologique auxquelles sont soumises la durée et la fonctionnalité du pollen.

Il est d'une importance primordiale de maintenir la plus grande proportion possible de grains de pollen dans un état viable en optimisant les conditions de conservation. Callaham (1967) a rapporté que dans le cas des lots de pollen où figurait du pollen mort, la quantité de graines produites ne se trouvait pas diminuée, sauf lorsque les lots comportaient moins de 30% de pollen viable. Cependant, si un lot de pollen a une faculté germinative considérablement amoindrie, il peut ne pas représenter la composition génétique du lot d'origine (Towill, 1985). Il faudrait alors avoir recours à le stockage à des températures cryogéniques pour retarder, dans la mesure du possible, les processus métaboliques et empêcher la mort subséquente

des grains de pollen. D'autres modes de conservation, à des températures plus élevées, peuvent être adéquats à court terme, mais ne suffisent pas pour la conservation génétique. Ci-dessous, nous nous concentrerons sur les problèmes liés à la cryopréservation du pollen.

Malheureusement, on dispose de bien peu de données sur la longévité des propagules, qu'il s'agisse de graines, de produits de la culture de tissus ou de pollen, à des températures extrêmement basses. Une étude effectuée pendant 8 ans sur la viabilité de pollen d'arbres stocké dans de l'azote liquide a démontré que, alors que la plupart des lots conservaient leur viabilité, d'autres voyaient la leur diminuer, la cause n'étant pas nécessairement liée à l'espèce ou à la variation de la teneur en eau (Ichikawa et Shidei, 1972c). Des caprices observés dans les tests pourraient cependant expliquer certaines de ces variations. En outre, il a été fait état d'une diminution de la viabilité du pollen de maïs (*Zea mays* L.) (Nath et Anderson, 1975) et de blé (*Triticum aestivum* var. *erythrosperrum*) stocké à -196°C pendant de courtes périodes (Andreica *et al.*, 1988), mais il s'agissait peut-être d'un artefact de la dessiccation.

La préservation cryogénique exige habituellement une dessiccation partielle afin d'éviter la formation de glace intracellulaire mortelle. Une telle dessiccation est généralement praticable dans le cas de grains de pollen bicellulaires qui possèdent une cellule végétative et une cellule générative au moment de la dissémination. Toutefois, il existe une seconde catégorie de pollen qui est tricellulaire au moment de la dissémination, la cellule générative ayant subi une mitose et produit deux cellules spermatogénèse avant la déhiscence de l'anthere (Brewbaker, 1967). Ces grains de pollen ont normalement une vie très brève et ne tolèrent généralement pas la dessiccation jusqu'à une teneur en eau assez basse pour permettre leur exposition à des températures inférieures au point de congélation (Towill, 1985).

Le groupe bicellulaire est le plus grand des deux, tout au moins chez les angiospermes (Brewbaker, 1967), et peut être subdivisé en deux catégories, selon que les mitochondries sont complètes ou incomplètes au moment de la déhiscence (Hoekstra et Bruinsma, 1980). Le pollen bicellulaire peut généralement supporter la dessiccation jusqu'à une teneur

en eau inférieure à 10% (du poids frais) [11,1% (du poids sec)] (Towill, 1985). Les témoignages à l'appui de l'hypothèse de Schürhoff (1926) voulant que le pollen tricellulaire soit plus avancé sur le plan phylogénétique continuent de s'accumuler (Brewbaker, 1967; Ottaviano et Mulcahy, 1989). La distinction entre pollen bicellulaire et tricellulaire a été mise en corrélation avec des différences physiologiques. Le pollen bicellulaire a une vie prolongée et croît longtemps *in vitro*, ce qui n'est pas le cas du pollen tricellulaire. Par ailleurs, le lieu et le type de la réaction d'incompatibilité chez les espèces auto-incompatibles diffèrent entre les deux groupes (Brewbaker, 1967). Hoekstra et Bruinsma (1975a) ont découvert que les grains de pollen tricellulaires ont un quotient respiratoire et un taux de respiration global plus élevés que le pollen bicellulaire. Cela s'explique par le fait que le pollen tricellulaire est disséminé au moment de la déhiscence avec des mitochondries pleinement formées, alors que celles du pollen bicellulaire sont incomplètes (Hoekstra, 1979).

On trouve un examen détaillé des différences entre ces deux groupes dans Brewbaker (1967), Mäkinen et Brewbaker (1967) et Stanley et Linskens (1974). Une classification systématique des groupes sur la base des tendances géographiques paraît futile. Brewbaker (1967) signale que la tricellularité semble être apparue indépendamment au sein de nombreuses familles végétales très divergentes dans le monde entier. Cependant, une classification basée sur le cycle vital donne à penser que la sélection gamétophytique mâle modifie nécessairement plusieurs processus biosynthétiques avant le début de la croissance du tube, de la période postérieure à la pollinisation (développement sur le style) à la période antérieure à la pollinisation (développement avant la déhiscence). Lorsque les grains de pollen se posent sur un style, ils commencent immédiatement à germer et leur lutte pour la survie est plus efficace (Ottaviano et Mulcahy, 1989). De telles différences qui sont liées au lieu où ils se développent sont documentées pour le pollen bicellulaire et tricellulaire. On trouvera un excellent examen de ces aspects de l'évolution du pollen des angiospermes dans Ottaviano et Mulcahy (1989, pages 41-43).

FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Qualité initiale

Il est d'une importance extrême de mettre au point une méthode de vérification de la viabilité du pollen qui corresponde adéquatement, et invariablement, à la capacité du pollen de produire des graines (Schoenike et Bey, 1981). Owens et Blake (1986) et van Buijtenen (comm. pers.) signalent que, bien que l'observation de la germination corresponde généralement à la capacité du lot de pollen de produire des graines, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, l'«effet de population», par lequel les grains de pollen agrégés germent mieux que les grains isolés (Ahlgren et Ahlgren, 1978), amoindrit la fiabilité du test de germination. Il faut également reconnaître que les dommages que subit accidentellement l'exine du pollen peut produire des artefacts donnant l'illusion de pollen en train de germer. Cela est particulièrement vrai du pollen tricellulaire (Hoekstra et Bruinsma, 1975a). L'identification du tube a été facilitée par l'utilisation d'un colorant bleu à base d'aniline pour déceler les calloses à l'aide d'un microscope U.V. (Hoekstra et Bruinsma, 1975a). En outre, la concentration optimale de saccharose, de bore et/ou de calcium et/ou le pH du milieu de germination sont souvent particuliers aux espèces (Cauneau-Pigot, 1988; Hall et Farmer, 1971; Koekstra et Bruinsma, 1975b). Le pollen vieilli exige souvent des concentrations plus élevées de sucre (Vasil, 1962) et/ou de bore (Visser, 1955) dans le milieu que le pollen frais pour une germination optimale. On a formulé l'hypothèse, pour le pollen de *Pinus* et de *Picea* qui a cette réaction, que la perméabilité au sucre du pollen stocké décroît (Kühlwein et Anhaeusser, 1951). Il a été démontré que le pollen séché et/ou stocké germe plus lentement in vivo (Barnabás et Fridvalszky, 1984; Heslop-Harrison, 1979) que le pollen frais. Barnabás et Fridvalszky (1984) ne préconisent donc la pollinisation avec du pollen stocké que dans des conditions environnementales optimales. Dans le cas du sapin de Douglas, on a laissé entendre que la pollinisation artificielle avec du pollen stocké dans de l'azote liquide accroissait le taux d'avortement des cônes par rapport à la pollinisation avec du pollen frais (Copes, 1985). Bien qu'il ne s'agisse pas là d'une différence importante, il semble que le pollen stocké produise un taux plus élevé d'avortement des cônes que le pollen frais. Des données de même nature ont été publiées par

Ganeshan (1986b), mais elles n'ont pas été analysées sur le plan statistique.

Exposée à des champs électromagnétiques, la germination *in vitro* a été stimulée. De telles conditions ont entraîné l'accroissement de la faculté germinative et de la vitalité germinative du pollen *in vitro*, et une diminution du temps de germination (Alexander et Ganeshan, 1990). Ces techniques peuvent améliorer la corrélation entre la viabilité *in vitro* et la quantité de semences produites *in vivo*. Cependant, lorsqu'on préserve le pollen en vue de la conservation génétique, il ne suffit pas de prédire simplement la quantité de semences qui sera produite (Callaham, 1967). La faculté germinative du pollen *in vitro* peut être faible alors que la quantité de semences demeure élevée, ce qui peut produire une descendance où la proportion de l'apport paternel en ADN est fortement modifiée par rapport à la population gamétique originelle. Cela est dû au fait que dans les tests de pollinisation *in vitro* on prélève des échantillons au hasard et qu'on additionne la faculté germinative des différents grains, alors que la fertilisation d'un mégamétophyte n'exige qu'un seul grain de pollen viable.

Des expériences où l'on a eu recours à des tests de conductibilité électrique et à une analyse de la densité optique par infrarouge du percolat de pollen ont donné des résultats contradictoires. Ching et Ching (1976), Foster et Bridgewater (1979) et Goddard et Matthews (1981) ont fait état de corrélations élevées avec la faculté germinative du pollen *in vitro*, alors que Moody et Jett (1990) n'ont trouvé à peu près aucune corrélation.

Diverses techniques de coloration ont été utilisées pour prédire la quantité de semences produites. Les résultats de l'utilisation d'acétocarmine ne correspondent pas vraiment à la viabilité réelle (Johri et Vasil, 1961). Nombre d'autres réactions à la coloration, la plupart essentiellement sur la cellule végétative, produites pour tenter de prédire la viabilité du pollen, n'ont pas été concluantes. En outre, des tentatives pour mettre en corrélation l'activité enzymatique des cellules végétatives et la viabilité n'ont produit que des résultats médiocres à cause de la persistance de l'activité enzymatique dans le pollen récemment mort (Heslop-Harrison et Heslop-Harrison, 1970; King, 1960). Même les tests

au tétrazole peuvent donner des résultats ambigus (Oberle et Watson, 1953). Alexander (1980) a créé pour le pollen un colorant à multiples usages qui, au dire de Gameshan (1986a, 1986b), distingue avec succès les grains en train de germer des autres. Cependant, on n'a pas tenté de vérifier si les grains qui n'étaient pas en train de germer étaient morts.

Heslop-Harrison et Heslop-Harrison (1970) se sont concentrés sur l'intégrité de la membrane de la cellule végétative des grains de pollen pour vérifier la viabilité. Ils ont émis l'hypothèse que si cette cellule présente une perméabilité normale elle est vraisemblablement viable. La perméabilité de la cellule a été testée par coloration avec du diacétate de fluorescéine, un produit chimique non fluorescent et non polaire qui sert de substrat pour le complexe enzymatique de la cellule, fait d'estérases (Rotman et Papermaster, 1966). L'hydrolyse au sein de la cellule produit de la fluorescéine qui ne sort pas des cellules viables intactes. L'accumulation de fluorescéine dans les cellules semble donc généralement fortement liée à la viabilité, tout au moins pour des durées de stockage très brèves. (Shivanna et Heslop-Harrison, 1981; Heslop-Harrison *et al.*, 1984).

Idéalement, la viabilité du pollen devrait être testée en saupoudrant des stigmates de la même espèce et en observant la germination du pollen *in vivo*. Holman et Brubaker (1926) étaient d'avis qu'il pouvait y avoir dans le stigmate des «substances» stimulant la formation du tube et contribuant à la fertilisation. Il est peut-être possible d'homogénéiser les stigmates et les styles des espèces intéressantes et d'inclure l'homogénat dans le milieu où se fait le test standard de germination. Knowlton (1922) a découvert que le pollen d'*Antirrhinum*, initialement incapable de germer dans un milieu artificiel, était stimulé à ce faire lorsqu'un morceau du stigmate était introduit dans le milieu. Hodgkin et Lyon (1986) ont été les premiers à déterminer de façon plus précise les facteurs essentiels à la germination du pollen à partir de tissus végétaux, ou la favorisant. Ils ont séparé l'homogénat tissulaire par chromatographie sur couche mince, étalé du pollen de la même espèce sur la mince bande et documenté les bandes sur lesquelles le pollen a germé vigoureusement.

Teneur en eau (TE)

Bien que le pollen bicellulaire soit généralement moins susceptible d'être endommagé mortellement par une diminution de la teneur en eau que le pollen tricellulaire, il a été démontré que la réduction de la TE à près de 0% était mortelle ou diminuait considérablement la longévité (Towill, 1985). Bramlett et Matthews (1991) ont démontré que dans le cas du pollen du pin taeda (*Pinus taeda* L.) congelé pendant un an à des températures allant de -4° à -20°C, la faculté germinative *in vitro* était respectivement de 94 et 91% pour le pollen ayant une teneur en eau (poids frais) de 9 et 7%, alors que dans le cas du pollen ayant une teneur en eau de 3%, la faculté germinative était de 73%. Le nombre total de semences produites et le pourcentage de semences pleines étaient plus élevés pour les lots stockés à une TE de 9 et 7% et plus faibles dans le cas des lots entreposés à une TE de 3%. Le pollen des espèces tricellulaires des genres *Tulipa*, *Clivia*, *Aesculus* et *Parnassia*, et de *Plantago media*, ne peut être séché pour atteindre une teneur en eau de moins de 40% (poids sec) [teneur en eau d'environ 28,5% (PF)], et le pollen de toutes les graminées doit être conservé à une TE élevée pour prolonger la viabilité ne serait-ce que de quelques jours (Stanley et Linskens, 1974). Cependant, Shi et Tian (1989) ont séché du pollen tricellulaire de seigle, atteignant une TE de 6%, et ont maintenu la viabilité pendant un an dans de l'azote liquide.

Towill (1985) signale que la tolérance minimum à la dessiccation varie selon les espèces, et que la TE initiale du pollen avant dessiccation peut influencer sur la survie. Il semblerait que, dans le cas du pollen bicellulaire, plus la TE initiale est basse, plus le pollen est en mesure de survivre à une nouvelle dessiccation. Il a été prouvé que c'était le cas pour le poirier du Japon (*Pyrus serotina*) (Akihama *et al.*, 1978) et le pin blanc de l'Ouest (*Pinus monticola* Dougl.) (Ching et Ching, 1964). La viabilité pendant le stockage des grains de pollen du poirier du Japon et du plaqueminier du Japon (*Diospyros kaki*) est inversement proportionnelle à leur TE avant le séchage (Akihama et Omura, 1986). Cependant, l'hypothèse selon laquelle plus la TE initiale du pollen est faible, mieux il survit à une dessiccation plus poussée, est confondue dans ces rapports avec le mode de dessiccation, c'est-à-dire la lyophilisation. Plus la TE initiale du pollen est faible, plus son exposition au vide est courte et plus le séchage sous vide

endommager le pollen (Livingston et Ching, 1967; Davies et Dickenson, 1971). Une expérience mieux conçue réalisée par Hoekstra et van der Wal (1988) a démontré que le pollen à TE très faible (environ 5-8%) est invariablement endommagé par un séchage plus poussé. Barnabás et Rajki (1981), qui ont fait sécher à l'air du pollen de maïs trinucéaire, ont découvert que l'éventail de TE optimal pour la survie pendant conservation à basse température et la production subséquente de graines était extrêmement large (9,8-25,6%). Toutefois, lorsqu'ils ont examiné leurs résultats fondés sur la proportion d'eau évaporée, un idéal très net s'est manifesté — la survie maximale était liée à une perte de 30% de teneur en eau. Au-dessus comme en dessous de ce chiffre, la production de graines était très inférieure. Il est difficile de concilier ces résultats avec les théories actuelles sur l'intégrité tant du plasmalemme de la cellule végétative que des mitochondries du pollen (Shivanna et Heslop-Harrison, 1981; Crowe *et al.*, 1989a, b). L'importance du mode de réhydratation dans le maintien de la viabilité du pollen ne peut être exagérée, et on doit se rendre compte que dans toutes les études citées plus haut, le mode de réhydratation vient compliquer la situation. De plus, l'étude de Barnabás et Rajki (1981) portait sur du pollen tricellulaire; la réaction physiologique de celui-ci à la dessiccation et à la réhydratation peut différer de celle du pollen bicellulaire.

Hoekstra et Bruinsma (1975b) ont découvert que la viabilité du pollen de différentes composées était inversement proportionnelle à la température et à l'humidité relative au moment de la récolte. Pour ce qui est du pollen de *Chrysanthemum cinerariaefolium* récolté à 24°C, la viabilité n'a été maintenue à environ 85% que si l'humidité relative était d'au plus 60%. Au-dessus de ce chiffre, on a observé une baisse marquée de la viabilité. Le pollen est vraisemblablement en équilibre avec l'humidité relative. Cela influence le taux de respiration du pollen aussi bien tricellulaire que bicellulaire, le taux de CO₂ évoluant peu si l'humidité relative est inférieure à 77% (Hoekstra et Bruinsma, 1975a). Par conséquent, en raison de la confusion relative à la quantité optimale d'eau à perdre avant le stockage, et à la nécessité de sécher le pollen avant de le stocker à des températures inférieures à zéro, il serait prudent de récolter le pollen lorsque l'humidité relative est faible (Barnabás et Fridvalszy, 1984).

Mode de dessiccation/réhydratation

La rupture du plasmalemme due à la dessiccation (Hoekstra et van der Wal, 1988; Crowe *et al.*, 1989a) et/ou les dommages dus au refroidissement et à l'inhibition lorsque du pollen sec absorbe rapidement de l'eau froide (Caffrey *et al.*, 1987) sont des causes possibles d'une moindre germination du pollen. En outre, les deux types de dommages ne sont pas nécessairement différents (Hoekstra et van der Wal, 1988; Sack *et al.*, 1988). On croit qu'un certain type de rupture se produit au cours de la transition qui fait passer les phospholipides d'une phase où ils forment un gel relativement rigide, à température ou teneur en eau relativement basses, à une phase fluide après inhibition. Les dommages ne dépendent pas du degré de saturation des queues hydrophobes de ces lipides (Hoekstra et van der Wal, 1988). De plus, dans le cas des membranes possédant de grandes quantités de phosphatidy-léthanolamine (PE) et d'autres phospholipides capables de former des tubes hexagonaux inversés (HII) (Simon, 1974; Crowe *et al.*, 1989a; Quinn, 1985), des dommages peuvent être subis après réhydratation à cause d'une fuite avant que les phospholipides ne retrouvent une forme lamellaire (Crowe *et al.*, 1989a) Par ailleurs, des dommages peuvent être causés par la production de radicales libres pouvant attaquer des liens non saturés dans les lipides et hydrolyser le lien ester des phospholipides avec libération des acides gras dans le plasmalemme (Niehaus, 1978), ce qui modifie la fluidité de la membrane.

Les dommages dus au refroidissement par inhibition subis par les membranes du pollen de *Typha* ont provoqué des modifications dans l'ultrastructure du pollen viable (Sack *et al.*, 1988). La différence la plus évidente entre le pollen viable et le pollen tué par des dommages dus à l'inhibition est l'incapacité du pollen mort de se dilater après hydratation (Gilissen, 1977; Hoekstra et van der Wal, 1988). Par conséquent, la capacité des membranes séchées de préserver leur organisation structurale est essentielle au rétablissement du pollen séché (Shivanna et Heslop-Harrison, 1981). Cette capacité est à son tour régie dans une certaine mesure par les propriétés des constituants de la membrane (caractéristiques des têtes polaires, longueur des queues d'hydrocarbures, présence de corps dissous stabilisateurs, etc.).

Crowe *et al.* (1989a, b) montrent que la stabilité de la forme lamellaire, genre cristal liquide, des membranes des phospholipides du pollen diminue fortement lorsque la TE est faible. Cette stabilité lorsque la TE est faible peut être augmentée par l'ajout de sucres tels que le saccharose et le tréhalose, qui peuvent remplacer l'eau autour des têtes polaires de phosphate et dilater la bicouche, provoquant la diminution des forces de van der Waal entre les queues. Hoekstra et van der Wal (1988) signalent aussi que certains glucide peuvent maintenir les phospholipides à l'état liquide à une TE inférieure à la normale et que le pollen arrivé à maturité a en général des taux élevés de sucres. Carpenter et Crowe (1988) ont montré que les glucides (saccharose) maintenaient la déshydrogénase lactique dans sa configuration originelle dans des conditions qui causeraient normalement sa dénaturation. De nombreux corps dissous, dont des sucres, sont exclus de façon préférentielle de tout contact avec les protéines en solution aqueuse. Cela produit un état instable sur le plan thermodynamique en raison des concentrations relatives élevées des corps dissous dans l'ensemble de la solution par rapport à celles observées autour de la protéine. La dénaturation de la protéine entraînerait une augmentation de sa surface, accroissant l'état défavorable sur le plan entropique. Certains corps dissous, mais pas le DMSO, qui protège les protéines des perturbations produites dans les solutions, servent également de cryoprotecteurs là où ils peuvent jouer ce rôle (Carpenter et Crowe, 1988).

Jain et Shivanna (1987) préconisent l'emploi de solvants non polaires pour le stockage du pollen. Après avoir examiné un vaste éventail de composés, ils ont découvert que moins un solvant est polaire, plus la faculté germinative du pollen après stockage est élevée. Ils ont émis l'hypothèse que les solvants non polaires permettaient la conservation d'un plasmalemme actif sur le plan osmotique (cristal liquide) dans les grains de pollen après réhydratation. Du pollen de *Crotalaria retusa* L. a été cueilli et séché pour atteindre une TE de 5,2% avant d'être stocké dans des solvants. Toutefois, ce pollen n'a pas été endommagé par la dessiccation, et l'expérience ne jette aucune lumière sur la cause probable de la mort du pollen en raison d'une rupture de membrane à TE basse. Il serait approprié d'utiliser ce système pour le stockage du pollen sensible à la dessiccation;

le pollen pourrait être réhydraté dans une atmosphère humide, et l'on pourrait en vérifier immédiatement la faculté germinative.

La lyophilisation a été une des méthodes les plus employées pour sécher le pollen à stocker *ex situ*. Cependant, cette technique a des conséquences sur la viabilité du pollen et est source de nombreuses difficultés. Il a été démontré que le séchage sous vide était la cause d'une modification de la viabilité, de la respiration et de la perméabilité chez le lis (*Lilium longiflorum* c.v. Ace) (Davies et Dickinson, 1971). Certains indices semblent indiquer que le taux de transport d'électrons est limité à la respiration dans le cas du pollen lyophilisé, ce qui nuit à la phosphorylation oxydante, à la production d'ATP. et, par conséquent, à la viabilité (Davies et Dickinson, 1971). Livingston et Ching (1967) ont découvert que la lyophilisation du pollen de sapin de Douglas [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] diminuait la viabilité. Cauneau-Pigot (1988) a démontré que le pollen fragile (pollen à exine mince) ne peut supporter la dessiccation par lyophilisation. Elle conclut donc que le choix d'une technique de dessiccation/préservation peut être dicté par la morphologie du pollen.

Nombre des problèmes que pose la corrélation entre la germination du pollen *in vitro* et la germination *in vivo* sont dus au contrôle de la réhydratation du pollen. De nombreux cas ont été documentés où la germination du pollen *in vitro* n'a été couronnée de succès qu'après réhydratation dans une atmosphère humide avant le test, alors que le pollen utilisé pour les tests *in vivo* germait bien sans qu'il ait été réhydraté avant d'être placé sur le stigmate (Dereuddre et Gazeau, 1986; Hecker *et al.*, 1986).

Le pollen tricellulaire peut être stocké plus longtemps à des humidités relatives plus élevées, mais la longévité varie considérablement (Towill, 1985). La vitesse de séchage du pollen varie en fonction de l'épaisseur de l'exine, mais ce facteur n'est pas lié à la sensibilité du pollen à la dessiccation (Towill, 1985).

Traitement avant dessiccation

Il a été démontré que le conditionnement au froid avant dessiccation avait un effet favorable sur la longévité du pollen chez certaines espèces. Du pollen de sapin de Douglas a été refroidi à 0°C pendant 36 jours et séché en même temps à l'air; sa durée de survie a été la plus longue lorsqu'il avait été subséquentement lyophilisé (Livingston et Ching, 1967). Le conditionnement au froid avant lyophilisation a accru aussi la longévité du pollen de pin blanc de l'Ouest (Ching et Ching, 1964). Même dans le cas du pollen à teneur en eau très élevée (70%), un taux de survie élevé a été obtenu en ayant recours à une technique de précongélation (Ching et Slabaugh, 1966). Le succès de ce traitement préliminaire ne se limite pas à la lyophilisation. L'exposition pendant 1 à 5 heures à des températures avant congélation de -15°C et de -30°C a produit un taux de survie élevé du pollen refroidi rapidement à -80°C ou à -196°C (Ichikawa et Shidei, 1972a, b). La température avant congélation et la durée d'exposition favorisant le plus la survie variaient selon les espèces. Mais le traitement au froid avant dessiccation n'a pas eu d'effet sur le pollen de cocotier (Whitehead, 1965). Akihama et Omura (1986) n'ont observé aucune différence en ce qui concerne la survie du pollen de six espèces si le pollen a été refroidi avant sa lyophilisation.

Température

Avant les années 1970, une grande partie des textes sur la conservation du pollen portaient sur la conservation de courte durée (1 à 2 ans) (Towill, 1985; voir aussi tableau 4). Cela permettait d'avoir recours à des températures allant de juste au-dessus de 0°C à légèrement en dessous de -30°C pendant toute la durée de conservation et de conserver au pollen un degré élevé de viabilité jusqu'à son utilisation dans des programmes de reproduction, etc. Cependant, ces températures ne suffisaient pas pour la conservation à long terme en vue de sauvegarder la diversité génétique présente dans un échantillon de pollen. Ching et Slabaugh (1966), travaillant avec du pollen bicellulaire de conifère, ont étudié par analyse par diffraction des rayons la formation de cristaux de glace au cours de la congélation. Des cristaux de glace ne se formaient pas dans le pollen à TE de 10% (PF), mais le faisaient à une TE de 36%. Des cristaux de glace décelables se formaient à environ -25°C et les grains de pollen où de la

TABLEAU 4.

Effet de la conservation du pollen sur la quantité de graines produites (nombre total de graines/fleur), poids des graines pleines, nombre de graines pleines/fleur, faculté germinative de la semence, et capacité de conservation de la semence en comparaison avec le pollen frais.

| Source | Espèces | Température de conservation | Durée de cons. | Quantité de graines | Poids des semence | Faculté germinative des semences | Cons. des semences |
|----------------------------|---|-----------------------------|----------------|---|-------------------|---|--------------------|
| Akihama <i>et al.</i> 1980 | pêcher poirier | -20°C -20°C | 9 ans 6 ans | Même | ---- | ---- | ---- |
| Bramlett & Matthews, 1991 | pin taeda | -18°C | 3 ans | Moindre | ---- | ---- | ---- |
| | pin taeda | -18°C | 10 ans | Moindre? | ---- | ---- | ---- |
| Crisp & Grout 1984 | broccoli | -196°C | 5 minutes | Même | Même | ---- | Moins bon |
| Ganeshan, 1986b | papayer | -196°C | 300 jours | Plus grand nombre de fleurs avortées avec du pollen stocké? | ---- | ---- | ---- |
| Ganeshan, 1986a | oignon | -196°C | 360 jours | Même | ---- | ---- | ---- |
| Haunold & Stanwood 1985 | houblon (<i>Humulus</i>) | -196°C | 1 an | Même | Même | Même | ---- |
| Hecker <i>et al.</i> 1986 | betterave à sucre | -196°C | 1 an | Moindre | ---- | Même | ---- |
| Ichikawa & Shidei, 1972c | <i>Pinus</i> , <i>Larix</i> , <i>Cryptomeria</i> | -196°C | 1 an | Même | Même | Même <i>Larix</i> , les autres non testés | ---- |
| Lee <i>et al.</i> 1985 | jojoba | -196°C | 2 ans | Même | ---- | ---- | ---- |

glace était décelable n'étaient pas viables. Une partie du pollen de *Pinus monticola* à teneur en eau d'environ 35% a été tué avant la formation de glace intracellulaire, ce qui a abaissé la faculté germinative du pollen irradié, qui est passée d'environ 95% avant la congélation à environ 68% après refroidissement à -25°C. On en a conclu que même si la membrane n'était pas percée il pouvait y avoir mort du pollen, et l'on a observé que le pollen congelé qui a survécu a mis plus de temps à germer que le pollen non congelé.

Comme dans le cas de la conservation des semences à comportement récalcitrant, celle du pollen tricellulaire nous place devant un dilemme. Le pollen à TE élevée respire à un rythme élevé et sa viabilité diminue rapidement. La congélation du pollen à TE élevée est mortelle à cause de ce qui se produit au cours de la formation de glace intracellulaire. D'autre part, la TE ne peut généralement être abaissée pour permettre de stocker à des températures sous le point de congélation; une telle dessiccation tuera aussi le pollen. Pour conserver ce pollen à long terme, il faudra probablement avoir recours à des températures cryogéniques. Le traitement du pollen sera complexe et sera probablement mortel pour une partie de l'échantillon de pollen.

Nombre de cycles de refroidissement/réchauffement

Koopowitz *et al.* (1984) ont découvert que la faculté germinative du pollen de *Gladiolus* dépendait du nombre de cycles de congélation-réchauffement qu'il avait subis. Du pollen de papayer à TE non précisée a pu tolérer au moins six cycles de congélation rapide et de réchauffement sans que sa viabilité en souffre (Ganeshan, 1986b). Ganeshan (1986b) a aussi présenté des résultats qui semblent montrer que le pollen d'oignon, à TE non précisée, pouvait être congelé et partiellement dégelé au moins quatre fois sans réduire de façon significative sa faculté germinative. Hecker *et al.* (1986) ont découvert que du pollen tricellulaire de betterave à TE d'environ 12% pouvait être partiellement dégelé et recongelé immédiatement sans que cela ait d'effet sur la faculté germinative. Les échantillons de propagules utilisés pour la conservation du plasma germinatif devraient de préférence ne pas être refroidis ni réchauffés plus d'une fois. Les échantillons utilisés pour des vérifications périodiques peuvent être

prémesurés et stockés séparément dans des ampoules différentes dans les mêmes conditions que le reste du lot de pollen.

Emploi de cryoprotecteurs

Le pollen bicellulaire, qui peut habituellement supporter la dessiccation à des TE permettant la cryopréservation, ne profiterait pas beaucoup de l'ajout de cryoprotecteurs. Toutefois, comme le pollen tricellulaire ne peut normalement être séché sans perte de l'intégrité membranaire et de la faculté germinative, il ne peut être congelé sans subir des dommages mortels en raison de la formation de glace intracellulaire. Le pollen tricellulaire pourrait donc être congelé et décongelé sans diminution de sa viabilité s'il pouvait être cryoprotégé.

Des recherches ont été effectuées sur des produits chimiques cryoprotecteurs et sur la façon dont ils agissent, qui permet au tissu hydraté d'être exposé à des températures basses sans qu'il se forme de cristaux de glace dans l'eau cellulaire libre (Meryman, 1966; King et Roberts, 1980). MacFarlane et Forsyth (1990) ont étudié une foule de produits chimiques cryoprotecteurs employés pour vitrifier des solutions aqueuses. La vitrification, la formation de «glace amorphe», ou «verre», se produit lorsque le refroidissement est si rapide que l'eau se solidifie sans s'orienter en cristaux. Les meilleurs cryoprotecteurs sont ceux qui servent de bases modérément solides, annulant la capacité de l'eau de former un réseau à forte liaison hydrogène à basse température. Deuxièmement, ils doivent augmenter considérablement la viscosité de la solution, diminuant par le fait même les taux de nucléation et de cristallisation. Enfin, les bases solides produisent de fortes interactions corps dissous-eau, ce qui conduit à une hausse de la température de transition vitreuse. On a observé que le butane-2,3-diol possédait toutes les caractéristiques énumérées ci-dessus (MacFarlane et Forsyth, 1990). Carpenter et Crowe (1988) ont montré comment divers corps dissous protègent la déshydrogénase lactique de toute dénaturation pendant la congélation (voir plus haut). En raison de la petite taille des grains de pollen et de la perméabilité en général élevée des exines du pollen tricellulaire, l'infusion de cryoprotecteurs ainsi que leur écoulement après le dégel devraient être plus faciles que dans le cas des graines et d'autres grands corps multicellulaires utilisés dans la culture de

tissus. Malheureusement, il n'existe aucun compte rendu de l'emploi de cryoprotecteurs et de la congélation subséquente de pollen tricellulaire, ce à quoi d'éventuelles recherches devraient remédier.

Atmosphère de conservation

La conservation dans le vide ou dans une atmosphère d'azote a accru la longévité du pollen de maïs par rapport à celle observée lorsqu'il était stocké dans de l'air dans les mêmes conditions de température et d'humidité (Nath et Anderson, 1975). Selon l'hypothèse actuelle expliquant pourquoi la conservation dans des atmosphères contenant de l'oxygène est plus nuisible que dans des atmosphères anoxiques, l'oxygène provoque la formation de radicules libres dans les tissus séchés (Heckly, 1978). Ces radicules libres peuvent attaquer les liaisons non saturées des lipides, particulièrement de ceux des membranes (Lehninger, 1982; Niehaus, 1978) et hydrolyser le lien ester des têtes polaires. La conservation dans l'azote liquide ou dans la vapeur d'azote devrait prévenir une telle dégradation.

FACTEURS GÉNÉTIQUES

Variation intraspécifique

Les variations dans la tolérance à la manipulation ont été documentées à un niveau strictement génétique. Dereuddre et Gazeau (1986) affirment que la variabilité intraspécifique et interspécifique en réaction à la congélation et/ou au séchage, et la physiologie du pollen tricellulaire, constituent les obstacles les plus importants à la conservation du pollen. Orckendon et Gates (1976a, b) ont découvert que la viabilité du pollen de l'oignon (*Allium cepa*) variait selon les anthères de la même fleur et selon les fleurs de la même ombelle. Dietze (1973) signale qu'on observe une sensibilité à la lyophilisation liée aux clones chez des espèces d'arbres, certains individus perdant leur faculté germinative tandis que d'autres de la même espèce la conservaient. Une importante variation de la germination entre arbres de la même espèce est observable dans le même peuplement (Farmer et Hall, 1975). En outre, une certaine variation de la tolérance à la manipulation peut être attribuable à des facteurs environnementaux et génétiques. Ahlgren et Ahlgren (1978) ont découvert que la viabilité du pollen varie d'une année à l'autre quelle que soit l'abondance. Dereuddre et Gazeau (1986) ont documenté des différences dans la résistance au

séchage et à la congélation entre espèces du genre *Prunus*, ainsi que des différences entre cultivars de la même espèce. Cependant, Hecker *et al.* (1986) n'ont pu trouver d'indice d'effets génétiques relativement à la tolérance à conservation du pollen de la betterave à sucre.

CONSERVATION DU POLLEN

Possibilités et limitations

L'utilisation du pollen en tant que véhicule pour la conservation des gènes comporte à la fois des avantages et des inconvénients :

Avantages

1. Lorsque l'espèce à préserver a des semences de type récalcitrant et réagit mal aux méthodes de culture de tissus, le pollen, s'il pouvait être stocké à long terme, constituerait le meilleur mode de conservation *ex situ*.
2. Des croisements contrôlés sont réalisables plus tard. Le pollen est facile à expédier et, après décongélation et réhydratation, il est prêt à être utilisé. Des croisements contrôlés peuvent être faits directement avec du pollen alors que, dans le cas des graines, on doit attendre que le semis soit mûr (Towill, 1985).
3. La conservation du pollen est moins onéreuse à cause de la petite taille des grains.
4. Les banques de pollen pourraient représenter de grandes populations, et l'haploïde est potentiellement utile pour l'élaboration de nombreux clones de plantes androgènes dont la constitution génétique est connue (Ottaviano et Mulcahy, 1989).

Inconvénients

1. Seulement la moitié du génome sera préservée, et la composition de cet ensemble de gènes peut différer considérablement de celle qui est souhaitée. Namkoong (1981) signale cependant que des allèles peuvent être recombinés dans les futures générations de reproduction s'ils persistent dans le pollen préservé. Néanmoins, les travaux de tri et de reproduction nécessaires pour une telle recombinaison sont décourageants.

2. La méthode de conservation du pollen peut entraîner la sélection de géotypes particuliers, modifiant la fréquence des gènes chez la descendance produite. Comme la loi de Hardy-Weinburg ne s'applique pas s'il y a sélection au niveau gamétophytique (Pallais *et al.*, 1986), cette situation pourrait conduire à la disparition définitive d'allèles rares.
3. Le stockage du pollen dépend manifestement de la survie et de la fertilité des femelles de l'espèce ou de leur survie pendant le stockage sous forme de tissus ou de semences et de leur croissance subséquente jusqu'à maturité. De plus, même après la pollinisation, les graines de nombre d'espèces d'arbres (*Pinus*, par exemple) ont besoin, pour se développer, d'une période de 18 à 24 mois au cours de laquelle les dommages causés par les insectes, l'avortement des fleurs, etc. peuvent être la cause de faibles rendements (Goddard et Matthews, 1981). Comme le produit final est de toute façon une graine qui doit germer et croître, et devenir une plante de taille suffisante pour être transplantée à l'extérieur, on minimise certainement les risques en utilisant les graines comme premier véhicule de la conservation génétique.

Ces considérations influent sur la décision stratégique d'utiliser le pollen pour la conservation des gènes. Une fois cette décision prise, on doit passer aux décisions tactiques sur la façon dont le pollen sera stocké. Tant la décision stratégique d'utiliser le pollen que les décisions tactiques quant à la meilleure façon de le stocker dépendent du type de pollen produit par l'espèce en question.

Le pollen bicellulaire ayant des mitochondries tout à fait développées (type I) ou développées de façon incomplète (type II) au moment de la déhiscence de l'anthere est relativement facile à entreposer en raison de sa tolérance à la dessiccation, laquelle permet de le congeler. Le pollen tricellulaire (type III) ne tolère généralement pas la dessiccation et ne peut être congelé à cause de sa teneur en eau élevée. La physiologie du pollen de type III est telle que sa longévité est très réduite par rapport à celle du pollen bicellulaire.

Besoins en matière de recherches

Parmi les considérations tactiques sur lesquelles on devra se pencher figurent la teneur en eau que doit avoir le pollen stocké, le mode de dessiccation si le pollen peut survivre au séchage, le mode de réhydratation du pollen séché, la température de conservation (elle dépendra de la durée de celui-ci), l'atmosphère de conservation et la nécessité d'employer un cryoprotecteur ainsi que le type utilisé.

Le pollen entreposé a produit des graines qui n'étaient pas différentes en ce qui avait trait au poids des graines pleines, au pourcentage de graines vides, ou à la faculté germinative (tableau 4). Toutefois, Crisp et Grout (1984) ont constaté que ces graines, bien qu'impossibles à distinguer à l'origine, perdaient rapidement leur viabilité par rapport à celles produites par le pollen frais lorsque des graines des deux sources polliniques étaient stockées. Ce phénomène, s'il s'avérait général, aurait des conséquences d'une portée considérable sur l'utilisation du pollen comme moyen de conservation génétique. Il exigerait la culture, immédiatement après la récolte, de semences produites à partir de pollen conservé, ce qui pourrait être peu réaliste, voire impossible.

Chapitre IV

CONSERVATION *EX SITU* PAR CULTURE *IN VITRO*

INTRODUCTION

Il existe de nombreuses publications (Bajaj, 1986; Bonga et Durzan, 1987 a,b,c; Hanover et Keathley, 1988; Ahuja *et al.*, 1988; Kartha, 1985b, Sharp *et al.*, 1984 a, b; George *et al.*, 1987, 1988; Evans *et al.*, 1986; Ammirato *et al.*, 1984, 1990; Von Arnorl et Wallin, 1988; Borman *et al.*, 1991) sur les méthodes de culture de tissus végétaux et des sujets connexes. Néanmoins, la documentation décrivant de façon détaillée l'utilisation de méthodes de culture de tissus pour la préservation du plasma germinatif est rare. De plus, nos connaissances actuelles sur la régénération à partir de culture de tissus sont très limitées dans le cas de nombreuses espèces végétales n'ayant pas d'importance économique. Cela limite la valeur de la culture de tissus en tant que méthode de conservation.

Il existe trois aspects importants de la préservation du plasma germinatif à l'aide de propagules produits par la culture de tissus :

1. les méthodes de multiplication *in vitro*;
2. les problèmes associés à la culture de tissus *in vitro*, par exemple les variations somaclonales et la maturation hâtive de plantes produites à partir de culture de tissus, qui peuvent avoir des effets profondément négatifs sur la conservation du plasma germinatif; et
3. les techniques de conservation à long terme de matériel par culture de tissus.

MÉTHODES

La préservation du plasma germinatif par culture de tissus constitue une méthode de conservation de rechange appropriée dans le cas de plusieurs vastes classes de plantes (Benson et Withers, 1988; Withers, 1980; Scowcroft, 1984; Biondi, 1986; Withers, 1990a, b, c; Ford-Lloyd et Jackson, 1991; Roca, 1989), entre autres :

1. les espèces qui ne peuvent être propagées que par multiplication végétative, par exemple, le bananier, le manioc, la pomme de terre, etc.;
2. les espèces ayant un long cycle vital et chez lesquelles la production de graines est très lente;
3. les espèces aux graines du type récalcitrant qui mourront si elles sont desséchées (par ex., la plupart des espèces tropicales, la cacaoyer, le manguier, le cocotier et l'avocatier);
4. les individus stériles possédant des particularités importantes (par ex. la récolte des embryons);
5. les propagules récoltées hors de la saison de dissémination des graines;
6. les espèces dont il faut enrayer les maladies pour en assurer la bonne conservation et la multiplication ultérieure.

La culture *in vitro* peut être définie comme la méthode par laquelle des cellules, des tissus, des organes végétaux et n'importe quelle partie d'une plante sont cultivés en milieu artificiel et aseptique (Scowcroft, 1984). Les tissus cultivés *in vitro* sont de deux sortes. Premièrement, les explants qui conservent intact leur potentiel de développement et ont une organisation précise, comme les méristèmes (extrémités des tiges et bourgeons axillaires). Deuxièmement, les explants qui se différencient pour passer à un état plus ou moins organisé, par exemple les embryons somatiques, les embryons gamétogéniques, les bourgeons adventifs. Le processus de différenciation peut être complet ou incomplet, allant du cal inorganisé à la formation d'un embryon. Les embryons somatiques ont été identifiés pour la première fois en 1958 par Steward *et al.* et Reinert dans des cellules de carottes. On les appelle «somatiques» parce qu'ils sont produits par des cellules somatiques et non par fusion gamétogénique (Ammirato, 1989) et «embryons» parce que leur structure est semblable à celle des embryons zygotiques. Le procédé d'embryogenèse somatique est également appelé embryogenèse adventive.

Les embryons gamétogéniques sont produits à partir de pollen immature et d'ovules non fécondés et donnent naissance à des plantes haploïdes. Les bourgeons adventifs sont produits par organogénèse, processus au cours duquel on provoque la production de nouveaux méristèmes sur des

tissus végétaux différenciés cultivés *in vitro*. Les différentes méthodes employées sont comparées au tableau 5. Les suspensions cellulaires et les protoplastes proviennent souvent d'autres tissus cultivés *in vitro* et servent à des usages extrêmement spécialisés comme la production de métabolites secondaires (suspensions cellulaires) et des mutations génétiques (protoplastes). Les suspensions cellulaires peuvent servir à la micropropagation. Les protoplastes, par ailleurs, sont d'un usage plus difficile à cette fin à cause de leur fragilité et de la spécificité des protocoles pour chaque génotype.

On a élaboré différents types de méthodes de culture de tissus convenant à différentes espèces. Néanmoins, certaines espèces sont «réfractaires» à la culture de tissus, ce qui constitue un important obstacle à l'utilisation de celle-ci pour la conservation du plasma germinatif. En général, les méthodes de culture de tissus ont été élaborées principalement pour les dicotylédones, et au sein de ce groupe les solanacées et les crucifères comportent des espèces modèles. Les monocotylédones sont plus réfractaires à la culture des tissus, particulièrement les graminées, mais on a procédé à des expériences importantes sur les palmacées et les iridacées (par ex. *Musa* sp.). Dans le cas des gymnospermes, les travaux ont surtout porté sur les conifères du genre *Pinus* qui sont relativement réfractaires à la culture de tissus. Mis à part le groupe des conifères, on a réussi à régénérer des cycas par embryogenèse somatique, mais il est difficile d'obtenir de bon résultats avec les ginkgos. On n'a pas encore expérimenté la culture de tissus sur des fougères arborescentes.

La culture de tissus d'espèces d'arbres et d'arbustes dans un but de conservation présente les avantages suivants (Engelmann, 1991):

- les taux de multiplication sont élevés et permettent la production rapide du matériel à préserver;
- les plantes sont cultivées en milieu aseptique dont sont absents les microbes pathogènes;
- elle ne nécessite qu'un espace relativement restreint;

- elle permet la production de plantes haploïdes;
- elle permet de récolter des embryons zygotiques qui normalement avorteraient;
- elle permet la conservation d'espèces ayant des graines du type récalcitrant et du pollen tricellulaire impossibles à préserver autrement.

Mais elle présente également certains inconvénients. En plus des problèmes de résistance à la culture des tissus dont nous avons déjà parlé ci-dessus :

- il faut énormément de temps et de travail pour préparer et conserver les lots qu'on veut utiliser pour la culture de tissus.
- il est difficile d'échantillonner un nombre adéquat d'arbres représentatifs en vue de leur conservation;
- il faut établir les conditions de culture *in vitro* (milieu de la culture, paramètres environnementaux) pour chaque espèce (parfois chaque génotype) à préserver;
- il existe des problèmes relatifs aux variations somaclonales et à la maturation hâtive des plantes régénérées (voir ci-dessous);
- en général, on constate une perte du potentiel morphogénique au fil du temps (Benson et Withers, 1988; Benson et Harding, 1991).

Les principaux problèmes posés par la conservation du plasma germinatif par culture de tissus sont le caractère réfractaire, les variations somaclonales et la maturation hâtive des plantes ligneuses régénérées. Nous allons maintenant aborder chacun d'eux.

TABLEAU 5.

Comparaison des méthodes de culture in vitro existantes pour la conservation du plasma germinatif des arbres et des arbrisseaux

| Explants | Avantages | Inconvénients |
|---|--|---|
| Méristèmes existants (Bourgeons apicaux et axillaires) | <ul style="list-style-type: none"> - Fréquence minimale des variations somaclonales - Faciles à multiplier - Conformes au type de matériel parental - Indépendants du génotype - Présence d'un génome complet - Nécessite peu de travail | <ul style="list-style-type: none"> - Possibilité de maturation hâtive - Problèmes d'enracinement chez certaines espèces |
| Méristèmes adventifs (Organogenèse) | <ul style="list-style-type: none"> - Présence d'un génome complet - Conforme au type de matériel parental | <ul style="list-style-type: none"> - Plus grande fréquence de variations somaclonales - Problèmes d'enracinement chez certaines espèces - Dépendant du génotype - Exige beaucoup de travail |
| Embryons somatiques (embryogenèse adventive) | <ul style="list-style-type: none"> - Variations somaclonales peu fréquentes chez la plupart des espèces - Bon développement des racines et du système aérien - Conforme au type du tissu-mère | <ul style="list-style-type: none"> - Dépendant du génotype - Exige beaucoup de travail |
| Embryons gamétogéniques (Embryogenèse adventive) | <ul style="list-style-type: none"> - Permet d'omettre le processus de fertilisation - Ne nécessite que des organes mâles ou femelles | <ul style="list-style-type: none"> - Génome haploïde - Dépendant du génotype - Pas conforme au type; résultats de la méiose, mais conforme au type dans la même lignée - Ne peut être obtenu qu'à partir des gamètes - Exige beaucoup de travail - Essais limités à quelques espèces d'arbres et d'arbustes |
| Embryons zygotiques (prélevés sur des graines, non sur des tissus en culture en même) | <ul style="list-style-type: none"> - Indépendant du génotype - Aucun risque de maturation hâtive - Exige peu de travail | <ul style="list-style-type: none"> - Il faut disposer de semences - Pas conforme au type; résultat du processus sexuel |

TABLEAU 5 suite

| Explants | Avantages | Inconvénients |
|---|--|---|
| Suspension cellulaire (Embryogénique ou organogénique) | Se référer à l'embryogenèse ou à l'organogenèse pour la régénération | |
| | - Possibilité de mise à l'échelle en utilisant la technologie des fermenteurs | - Fréquence accrue de variations somaclonales |
| Protoplastes (Embryogéniques ou organogéniques) | Se référer à l'embryogenèse ou à l'organogenèse pour la régénération | |
| | - Permet la culture de tissus à partir d'une cellule unique | - Fréquence maximale de variations somaclonales - Il faut élaborer des méthodes pour chaque génotype - Exige énormément de travail |
| ADN isolé | - Demande des quantités infimes de matériel végétal - Reproduction exacte de l'ADN parental - Peut être amplifié artificiellement - Exige peu de travail - A partir de tissus morts ou vivants | - Impossible de régénérer une plante complète - Ne permet de conserver que l'information génétique de l'arbre parent - En dernier recours seulement - On ne pourrait transférer que quelques gènes en même temps dans un génome hôte différent |

VARIATIONS SOMACLONALES OBSERVÉS DANS LES TISSUS EN CULTURE

L'expression «variation somaclonale» a été utilisée pour la première fois par Larkin et Scowcroft (1981) pour désigner la variation génétique découverte dans les «somaclones», des plantes régénérées à partir de n'importe quel type de tissu cultivé *in vitro*. On considère la variation somaclonale comme le principal obstacle à l'utilisation de la culture de tissus végétaux pour la propagation sur une grande échelle et la conservation du plasma germinatif. Néanmoins, il se produit dans la nature même des variations génétiques (Walbot, 1985; Orton, 1984; Poethig, 1989), ce qui peut jouer un rôle

dans l'apparition de variations somaclonales. Par conséquent, les variations génétiques naturelles doivent être prises en considération lorsqu'on évalue dans quelle mesure une méthodologie de culture de tissus donnée permet la conservation du plasma germinatif. Nous y reviendrons plus en détail à la fin de cette partie.

De nombreuses communications ont été publiées sur les variations somaclonales, où l'on souligne qu'il s'agit d'un phénomène très répandu dans le monde végétal. Il n'entre pas dans le cadre du présent texte d'en faire un compte rendu exhaustif; toutefois, il est important de préciser l'état des connaissances dans ce domaine et d'établir un rapport entre ce phénomène et la conservation du plasma germinatif.

On observe souvent des variations dans la culture de tissus végétaux, mais elles ne sont pas toutes de type somaclonal. Elle doivent, pour l'être, posséder quatre caractéristiques (De Klerk, 1990). Premièrement, la variation doit être transmissible à la descendance par méiose. Deuxièmement, elle doit être irréversible. Troisièmement, elle doit se produire chez des végétaux régénérés et, quatrièmement, la variation doit être aléatoire. La variation somaclonale peut être confondue avec les changements épigénétiques, réversibles et prévisibles, que subissent des plantes régénérées à partir de n'importe quel type de méristème (adventif, apical et axial) et qui sont dus à des mécanismes physiologiques. Un bon exemple de variation épigénétique est l'accoutumance des tissus cultivés *in vitro* (Binns, 1981). Les tissus ainsi accoutumés sont capables de croître sans régulateurs de croissance et cette caractéristique peut disparaître après la régénération de la tige.

Les variations somaclonales peuvent être associées au processus de dédifférenciation des tissus végétaux cultivés *in vitro* (Scowcroft, 1984; Karp et Bright, 1985). En général, les explants qui se dédifférencient et subissent le procédé d'embryogenèse somatique ou organogénèse pour produire des méristèmes adventifs donnent naissance à des végétaux chez lesquels on observe de fréquentes variations somaclonales (Karp, 1989). Les explants qui conservent leur potentiel de développement, comme les extrémités des tiges et les bourgeons axillaires (méristèmes apicaux et

axiaux), donnent très rarement naissance à des plantes présentant des variations somaclonales. Les facteurs qui influent sur la fréquence des variations somaclonales vont du stade de développement et du niveau de ploïdie de l'explant aux facteurs d'ordre physique qui ont un effet sur l'explant en culture ainsi que sur l'âge et le nombre de cycles de culture de tissus (De Klerk, 1990; Karp et Bright, 1985; Orton, 1984; Larkin, 1987). Habituellement, les tissus auxquels on conserve une différenciation partielle (embryons somatiques) présenteront moins de variations que les tissus propagés sous forme de cals dédifférenciés. Ces facteurs sont résumés au tableau 6. La variabilité génétique est ordinairement plus fréquente et davantage tolérée chez les individus polyploïdes que chez ceux qui sont monoploïdes ou diploïdes. Néanmoins, on émet l'hypothèse que la reproduction de gènes chez les polyploïdes amortit les déséquilibres causés par les mutations génétiques, tandis que dans le cas des individus monoploïdes, les effets des modifications négatives se manifestent immédiatement. Le nombre de cycles de culture de tissus et la durée de la culture provoquent souvent des variations somaclonales.

On s'est efforcé de définir les variations somaclonales à différents niveaux (Orton, 1983; Larkin, 1987). À l'origine, on a enregistré les changements phénotypiques, mais ces observations se sont avérées peu fiables. D'autres outils, par exemple la cytologie, les marqueurs biochimiques (isoenzymes), et, récemment, les polymorphismes de longueur de fragments de restriction (PLFR) et l'ADN polymorphe amplifié de façon aléatoire ont été utilisés pour l'étude des variations somaclonales. Néanmoins, la plupart des données existantes sur les variations somaclonales concernent l'étude du lot chromosomique de cellules dans la culture de tissus. Parmi les modifications observées au niveau des chromosomes, on trouve l'aneuploïdie, la polyploïdie, les aberrations mitotiques, la perte de l'ADN satellite, la translocation, la délétion, la fusion centrique, les inversions, le dédoublement, les cassures, et les modifications interchromosomiques. Le principal problème lors des analyses des variations somaclonales, a résidé dans la nature des observations. Les seules données concluantes sur le plan génétique sont celles obtenues par les marqueurs de PLFR et la cartographie (Orton, 1983), qui permettent de déceler les mutations au niveau de l'ADN. On en a observé des exemples

dans les cas de désamplification et d'amplification des gènes, de mutations génétiques uniques, de mobilisation des éléments transposables (Evans, 1989; Larkin, 1987), et des remaniements de l'ADN mitochondrial (Evans, 1989).

Une question importante est l'origine des variations somaclonales. On croit qu'il s'agit soit d'une particularité intrinsèque des cellules végétales, soit d'une particularité créée lors de la culture de tissus (Orton, 1984). Ceci est d'une importance primordiale pour évaluer la culture de tissus en tant que méthode de conservation. Si les variations somaclonales qui se produisent lors de la culture de tissus ont leur équivalent dans la nature elles ne représentent pas un si grand inconvénient pour la conservation. Récemment, des conclusions en ce sens ont été publiées (Edwards *et al.*, 1990). Il existe dans la cellule de la plante, qui subit une mitose un taux d'erreur intrinsèque qui est la source principale de la sélection naturelle. Dans des conditions normales *in vivo*, le processus de différenciation est extrêmement strict et inhibe sévèrement la survie des cellules anormales tandis que dans des conditions *in vitro*, cette inhibition est moindre et la perpétuation des variations génétiques est plus fréquente. Dans les deux cas, les variations génétiques dues au taux d'erreur sont cumulatives et pourraient être accentuées par la méthode de culture de tissus.

Ce phénomène est donc vraisemblablement à l'origine un processus naturel du développement des plantes (Walbot, 1985. Poethig, 1989). Les plantes, contrairement aux animaux, ne peuvent se déplacer pour échapper au stress que leur fait subir leur environnement. Des changements physiologiques sont indispensables à leur survie. Une des caractéristiques anatomiques importantes des plantes est le méristème apical qui produit continuellement de nouveaux organes et méristèmes, dont des tissus du système reproducteur, de telle façon que chez la plupart des plantes, la différenciation des gamètes se produit à la périphérie de la plante après une forte croissance et un certain temps. Les mutations somatiques du méristème peuvent donc avoir une grande incidence sur les branches ultérieurement formées ainsi que sur la descendance sexuée et asexuée. Cela pourrait s'avérer un mécanisme important permettant d'assurer la variabilité génétique nécessaire à la survie d'espèces végétales dans un

environnement dynamique. Par exemple, la résistance à l'insecte *Anoplognathus montanus* dans certaines branches du même *Eucalyptus* a été identifiée comme une mutation somatique «provoquée» par un accroissement de la pression sélective (Edwards *et al.*, 1990), caractéristique qui peut être transmise à la descendance. Un autre exemple est la formation de mutations somatiques sur les bourgeons des arbres fruitiers; certaines seront transmises à la descendance, tandis que d'autres provoqueront la stérilité des fleurs stériles et ne pourront être transmises naturellement (Walbot, 1985). Ce développement naturel en mosaïque chez les plantes prouve que les variations somatiques ne se limitent pas à la culture des tissus *in vitro*. Cela contredit l'opinion selon laquelle les mutations génétiques chez les plantes ne sont très fréquentes que dans le cas de tissus en culture.

Les variations somaclonales constituent un problème pour la multiplication de clones identiques à l'original d'une espèce. Par conséquent, en choisissant des systèmes de culture de tissus, on devrait en tenir compte en s'efforçant d'utiliser la méthode la moins susceptible de provoquer des mutations génétiques (voir tableau 6). Néanmoins, dans le cas de la conservation du plasma germinatif, les variations somaclonales pourront avoir une incidence moins importante, des mutations de ce genre se produisant de façon aléatoire dans la nature. En outre, le processus de régénération éliminera la plupart des mutations indésirables. On a découvert que nombre de mutations génétiques provoquées par des variations somaclonales ont des effets néfastes sur la régénération *in vitro*. Ce processus peut donc permettre d'empêcher de nombreuses mutations indésirables (Wershun, 1989) sans perte de tissus, car seules les cellules normales seront régénérées. Cela est également vrai dans le cas de la gamétogénèse, de la fertilisation et du développement des embryons.

Tableau 6. Niveaux relatifs généralement acceptés de variation somaclonale dans la culture in vitro de matériel végétal.

| Méthodes de culture de tissus | Niveau relatif de variation |
|---|-----------------------------|
| Méristèmes (apicaux + axillaires) | BAS |
| Masses embryogéniques - embryons somatiques - embryons gamétogéniques | ↓ |
| Cal inorganisé - bourgeons adventifs | ↓ |
| Suspensions cellulaires | ↓ |
| Protoplastes | ÉLEVÉ |

En tenant compte de nos connaissances actuelles sur les variations somaclonales dans la culture de tissus, les lignes directrices suivantes ont été proposées pour limiter les conséquences de ce problème (Karp, 1989);

- le tissu à partir duquel on procède à la culture devrait être choisi parmi des géotypes stables et de préférence des espèces diploïdes. Il vaut mieux éviter les tissus spécialisés ou ceux qui sont vieux;
- la durée de la culture «active» devrait être aussi courte que possible, et on devrait préférer des systèmes de régénération causant le moins de variations possible. (Par exemple, on a démontré que dans le cas de *Solanum tuberosum* une croissance lente provoquait une plus forte variation que la cryopréservation (Harding, 1991));
- les composantes du milieu de culture de tissus qui risquent d'être mutagènes (par ex. l'acide 2,4-D) devraient être évitées.

MATURATION PRÉCOCE DES CULTURES *IN VITRO*

On observe souvent le phénomène de maturation précoce chez les plantes ligneuses produites à partir de cultures de tissus. La maturation précoce retarde la croissance des arbres plantés et a pour conséquences une diminution de leur taux de croissance, une diminution ou un arrêt total de l'enracinement, la floraison précoce, et le plagiotropisme (Pierik, 1990; Bonga et von Aderkas, 1993). Ces caractéristiques indésirables sont généralement associées à l'utilisation de tissus d'arbres mûrs comme explants; néanmoins, le phénomène a également été observé sur des plantes produites à partir de matériel jeune (Bonga *et al.*, in Hanover et Keathley, 1988). On a avancé l'hypothèse que la maturation précoce est due à un système racinaire qui «réduit» ou «empêche» la production de cytokinine.

Dans le cas des espèces d'arbres ou d'arbustes, il est essentiel que la méthode de culture de tissus engendre un rajeunissement afin d'éviter les problèmes de maturation précoce. L'embryogenèse somatique utilisée comme méthode de culture de tissus a cet effet positif. Néanmoins, on n'a pas encore réussi à appliquer l'embryogenèse somatique à des tissus provenant de conifères matures. La culture de méristèmes, bien que difficile, est une excellente technique de rajeunissement et a été utilisée pour de nombreuses espèces ligneuses (Pierik, 1990). Le développement de méristèmes adventifs *in vitro* a été utilisé comme procédé de rajeunissement, mais le succès de cette méthode semble dépendre du nombre de cycles de sub-culture toléré par le tissu cultivé *in vitro*. Les méristèmes adventifs ont probablement une forte tendance à la maturation précoce. Il est intéressant de noter que la technique de la microgreffe, qui consiste à greffer un méristème adulte sur de jeunes porte-greffes *in vitro*, a été utilisée avec succès pour rajeunir des tissus mûrs et constitue une autre voie possible pour la conservation *in vitro* d'arbres et d'arbustes à partir de tissus mûrs (Misson et Giot-Wirgot, 1984; Tranvan et David, 1985; Monteuis, 1986).

La maturation précoce est chez les plantes ligneuses un phénomène nuisible qui ne permet pas d'utiliser la culture de tissus comme méthode de conservation. Il s'agit également d'un problème difficile à résoudre, ce

phénomène se manifestant seulement une fois le cycle de culture de tissus terminé.

MÉTHODES DE CONSERVATION DE CULTURES *IN VITRO*

Une fois les tissus végétaux établis *in vitro*, il faut choisir une méthode efficace pour les conserver à long terme. Bien qu'on puisse atteindre en partie cet objectif en procédant régulièrement à des sub-cultures dans des milieux de culture frais, il n'est pas souhaitable de procéder ainsi pour la conservation à long ou à moyen terme du plasma germinatif à cause du risque de contamination microbienne ou d'une panne de l'équipement, et du travail et des coûts que cela représente. Les problèmes dus aux variations somaclonales et à une diminution de la faculté de morphogenèse sont également fréquents. Il existe deux méthodes qui atténuent ou éliminent ces problèmes, la croissance lente et la cryopréservation. On est actuellement en train de mettre au point une autre méthode, la préparation de semences artificielles, qui pourrait être jumelée à la conservation du plasma germinatif pour certains emplois spécifiques.

On entend par méthodes de croissance lente toutes les méthodes de culture de tissus qui ont pour but de réduire le taux de croissance des tissus végétaux *in vitro* (Withers, 1990a, b, 1991, 1989; Engelmann, 1990, 1991). On relève également dans la littérature des termes comme limitation de la croissance, inhibition de la croissance et croissance minimale. Le but de cette méthode est d'obtenir la plus longue période de sous-culture sans effets néfastes pour les tissus végétaux (Engelmann, 1990; Withers, 1991). Pour y parvenir, on peut utiliser une ou toutes les techniques suivantes (Withers, 1990a, b, c, 1991; Engelmann, 1991) :

- réduire la température;
- ajouter des inhibiteurs de croissance;
- réduire la concentration d'O₂;
- réduire l'intensité de la lumière;

- diminuer les éléments nutritifs contenus dans les milieux dans lesquels le tissu est cultivé;
- choisir des explants de petite taille;
- utiliser un petit récipient pour la culture de tissus;
- ajouter des produits chimiques ayant des propriétés osmotiques.

Même si la croissance lente est une technique largement utilisée (Engelmann, 1990; Roca, 1989), certaines techniques comme la réduction de la température ne peuvent être utilisées de manière aussi efficace ni aussi radicale avec des espèces tropicales, parce que celles-ci sont habituées à des températures plus élevées (Withers, 1991). De plus, cette méthode ne résout pas les autres problèmes associés à la culture de tissus, entre autres les variations somaclonales. Il existe également un risque de pression sélective non désirée, en raison du stress causé par cette méthode, ce qui modifie la quantité d'allèles dans les tissus conservés.

La cryopréservation est peut-être la méthode la plus appropriée pour le stockage à long terme des cultures de tissus des plantes. Pour une description exhaustive des techniques de cryopréservation, le lecteur devrait consulter Kartha (1985b). De plus, même si Sakai (Sakai, 1984, 1986) a procédé à de nombreuses expériences de cryopréservation sur des explants prélevés sur des plantes ligneuses, il n'en sera pas question ici, car il ne s'agit pas véritablement de culture de tissus. En théorie, les tissus végétaux peuvent être stockés indéfiniment lorsqu'ils sont cryopréservés; toutefois, dans le cas des cellules animales, on a évalué que les radiations naturelles leurs causeraient des dommages irréversibles après 10 000 ans (Ashwood-Smith et Friedman, 1979).

La cryopréservation des tissus végétaux comporte plusieurs étapes qu'il faut optimiser pour chaque type de tissu (Engelmann, 1991; Karthe, 1985a) :

1. Choix du matériel végétal

De préférence du matériel jeune à croissance rapide plus résistant au gel parce que de plus petite taille, possédant moins de vacuoles ou des vacuoles plus petites, et un cytoplasme dense.

2. Prétraitement

Déshydratation des tissus et protection des membranes cellulaires. La méthode de prétraitement varie en fonction de l'espèce végétale et du système de culture de tissus.

3. Congélation

Nécessaire pour empêcher les dommages que pourrait causer la formation de glace. Lorsqu'on les refroidit lentement, les cellules perdent de l'eau pour équilibrer l'augmentation de la concentration de corps dissous hors de la cellule produite par la formation de glace extracellulaire. La congélation rapide jusqu'à des températures cryogéniques ne produit que de l'eau résiduelle et ne provoque que d'infimes dommages dus à la formation interne de glace. Des cryoprotecteurs comme le DMSO et le sorbitol sont utilisés pour protéger la cellule en abaissant la température de congélation et en modifiant le mode de cristallisation de la glace. On peut également avoir recours au refroidissement rapide, qui permet la formation de glace microscopique sans recristallisation. Toutefois, ce procédé s'est avéré moins efficace (Sakai *et al.*, 1978; Kartha *et al.*, 1980).

4. Conservation

La méthode de conservation n'est pas elle-même fondamentale à condition que la température de conservation soit inférieure à -140°C , niveau auquel il y a arrêt complet du métabolisme.

5. Décongélation

Il faut procéder de manière à ce qu'aucun dommage ne soit causé à la cellule par formation de cristaux de glace intracellulaires.

6. Traitement postérieur

Ce procédé a pour but de diluer les effets toxiques des cryoprotecteurs et d'amoindrir le choc osmotique.

On a récemment mis au point un procédé de cryopréservation simplifié qui n'exige pas l'utilisation d'un congélateur programmable sophistiqué (Lecouteux *et al.*, 1991). On procède de la façon suivante : 1) on traite préalablement les embryons somatiques avec du saccharose en guise de cryoprotecteur, 2) on les congèle dans un congélateur domestique à une température de -20°C pendant 24 heures; et 3) on les immerge dans de l'azote liquide. Cette méthode a produit un taux élevé de survie (80%) et pourrait constituer une solution au problème de la pénurie d'équipement coûteux dans les laboratoires.

Habituellement, la cryopréservation des tissus végétaux est plus facile dans le cas de cultures de cellules inorganisées et plus difficile dans celui de structures hautement organisées (Kantha, 1985a). Les tissus dont l'organisation structurale est élaborée sont constitués de populations de cellules hétérogènes qui réagissent tout différemment au procédé. Par exemple, il est difficile de cryopréserver les méristèmes, et l'on constate souvent qu'il en résulte des dommages à leur structure (Withers, 1990). Par ailleurs, on a réussi à cryopréserver des embryons zygotiques et somatiques ainsi que des tissus produits par embryogenèse somatique (Pence, 1990; Engelmann, 1990, 1991; Klimaszewska *et al.*, 1992). C'est au niveau organisationnel que résident les problèmes dans le cas des embryons. Ils ne doivent subir aucun dommage qui mettrait en péril le retour à la normale de toute la structure, et il faut protéger les cellules régénératrices pour assurer la reprise de leur croissance après congélation.

On peut avoir recours, pour les structures organisées, à une variante de la cryopréservation, c'est-à-dire la vitrification. Cette technique consiste à refroidir les tissus extrêmement rapidement à un rythme de -30°C à -80°C par *seconde* (atteignant ainsi la température finale de -196°C presque immédiatement, en quelques secondes au maximum). On utilise une solution à haute teneur en cryoprotecteurs, tels que le DMSO, le glycérol et l'éthylèneglycol (Towill, 1990; Sakai *et al.*, 1990; Langis et Steponkus,

1990; Langis *et al.*, 1989; Uragami *et al.*, 1989). On réchauffe les tissus tout aussi rapidement pour leur permettre de reprendre leur croissance. Ce procédé ne provoque pas la formation de glace, mais plutôt de verre à l'intérieur des cellules, ce qui évite les dommages intracellulaires. Cette technique n'est pas encore au point, mais pourrait s'avérer une solution viable pour la préservation de structures organisées comme les explants de méristèmes et les plantules issues d'embryons somatiques.

Un des problèmes importants posés par la cryopréservation des tissus végétaux est l'arrêt soudain de l'activité métabolique à tous les niveaux. Cela a pour résultat d'interrompre la division cellulaire et la reproduction de l'ADN avant qu'elles ne soient terminées, ce qui peut avoir des conséquences néfastes au niveau cellulaire et pourrait provoquer des mutations génotypiques (DeVerno *et al.*, 1992).

La production de semences artificielles est une méthode de conservation du plasma germinatif qui semble prometteuse. Les techniques ne sont pas encore au point, mais elles pourraient éventuellement jouer un rôle dans des programmes globaux de conservation. Un des prérequis à l'utilisation de cette méthode est la possibilité de provoquer l'embryogenèse somatique chez les espèces choisies. En conséquence, elle s'inspire d'autres techniques de culture de tissus. La majeure partie des travaux dans ce domaine ont été effectués avec des espèces comme la carotte, la laitue, le céleri et la luzerne (Redenbaugh, 1990; Redenbaugh et Ruzin, 1989; Redenbaugh *et al.*, 1987, 1988). L'objectif était de reproduire la graine naturelle, qui consiste en un embryon zygotique entouré d'enveloppes protectrices et nutritives. Lors des premiers essais, on a recouvert les embryons somatiques d'un hydrogel. Ce type d'enduit empêche les embryons de se dessécher et peut leur fournir des éléments nutritifs et des substances protectrices. Cette technique peut être utilisée avec des semences du type tant orthodoxe que récalcitrant. Récemment, on a réussi à cryopréserver des graines artificielles de carottes (Dereudde *et al.*, 1992). Ces expériences ouvrent la voie à l'intégration de cette technique aux autres stratégies de conservation.

Une variante consiste à dessécher des embryons somatiques qu'on enduit ensuite d'une couche protectrice d'une substance contenant des éléments nutritifs et des agents protecteurs. Cette variante pourrait être utilisée à des fins de conservation du plasma germinatif, mais seulement dans le cas de semences de type orthodoxe dont les embryons peuvent être séchés sans dommage. Des expériences avec de la luzerne ont démontré que des embryons séchés pouvaient survivre à long terme (McKersie *et al.*, 1989). De plus, des méristèmes apicaux contenus dans des capsules peuvent être cryopréservés et servir à la conservation du plasma germinatif (*Eucalyptus*; Poissonnier *et al.*, 1992).

En résumé, la technologie des semences artificielles a le potentiel nécessaire pour permettre la conservation du plasma germinatif, mais doit être développée pour pouvoir être appliquée à un plus vaste éventail d'espèces. Le tableau 7 compare les différentes méthodes de conservation. À partir de ces comparaisons, on peut conclure que la méthode de conservation de tissus végétaux la plus prometteuse actuellement est la cryopréservation.

CONSERVATION DE L'ADN

Peu de chercheurs ont décrit l'utilisation de l'ADN comme dernier recours pour la conservation du plasma germinatif des plantes. L'ADN est le support de tout le matériel génétique d'une plante, et, à l'aide des techniques de séquençage des gènes, cette information peut être décodée et emmagasinée. Les gènes eux-mêmes peuvent également être stockés comme l'ADN et servir à la conservation du plasma germinatif. Cette option doit être sérieusement envisagée lorsqu'il n'existe aucune autre possibilité. De plus, cette méthode est actuellement utilisée en Australie (Mattich *et al.*, 1992) et aux É.-U. (Giannasi, 1992). Nous invitons le lecteur à consulter les comptes rendus de Peacock (1989), Ford-Lloyd et Jackson (1991), et Adams et Adams (1992).

Les facteurs qui rendent possible l'utilisation de l'ADN pour la préservation du plasma germinatif sont la quantité de matériel nécessaire et la possibilité de réintroduire l'ADN par des méthodes de modification génétique dans des génotypes ou des espèces apparentés de la plante

TABLEAU 7.

Comparaison des méthodes de conservation par culture *in vitro*.

| Méthode | Avantages | Inconvénients |
|------------------------|--|---|
| Sub-culture | <ul style="list-style-type: none"> - Tissu prêt à être multiplié - Tous genres de tissus | <ul style="list-style-type: none"> - Méthode à court terme (1 semaine à 2 mois) - Exige beaucoup de travail - Exige de l'espace - Fréquence élevée de variations somaclonales - Risque important de pertes dues à une erreur humaine (par ex. contamination) - Diminution de la faculté morphogénique |
| Croissance lente | <ul style="list-style-type: none"> - Tissus prêts à être multipliés - Tous types de tissus | <ul style="list-style-type: none"> - Méthode à court et à moyen termes (2 mois à 2 ans) - Variations somaclonales - Risque de pertes dues à une erreur humaine - Méthodologie différant selon les espèces - Diminution de la faculté morphogénique (moins probable qu'avec la sous-culture) |
| Cryopréservation | <ul style="list-style-type: none"> - Espace minimum requis - Approche à long terme (durée en théorie infinie) - Le tissu est en état d'arrêt métabolique; faibles variations somaclonales (Harding, 1991) | <ul style="list-style-type: none"> - Nécessite un équipement complexe (sauf si on a recours au procédé simplifié) - Il faut faire redémarrer la croissance des tissus avant de les multiplier - Pas très élaborée pour les tissus organisés - Cette méthodologie doit être élaborée au cas par cas pour chaque espèce |
| Vitrification | <ul style="list-style-type: none"> - Les mêmes que dans le cas de la cryopréservation; plus adaptée aux tissus organisés | <ul style="list-style-type: none"> - Nécessite un équipement complexe - Il faut faire redémarrer la croissance des tissus avant de les multiplier - Cette méthodologie doit être élaborée au cas par cas pour chaque espèce |
| Semences artificielles | <ul style="list-style-type: none"> - Les propagules sont prêtes à être semées - Le tissu est dans un état latent, faibles variations somaclonales - Minimum d'espace requis | <ul style="list-style-type: none"> - Méthodologie en cours d'élaboration - Ne peut être utilisée avec tous les types de matériel de culture de tissus (structure du genre embryon) ou de méristèmes - On ne connaît pas la période de stockage possible |

originelle. Étant donné le progrès de la biologie moléculaire, comme les réactions en chaîne de la polymérase jumelées au clonage des gènes, il est possible de n'utiliser que des quantités infimes de tissus pour produire un éventail exhaustif de tous les ADN du génome d'une plante (White *et al.*, 1989). En outre, l'ADN peut être isolé des tissus morts, permettant l'accès à de l'information qui serait perdue si on n'utilisait que des tissus vivants (Pyle et Adams, 1989; Rollo *et al.*, 1991; Pääbo *et al.*, 1989). Cette faculté d'isoler l'ADN en petites quantités peut être associée à des méthodes de modification génétique plus puissantes qu'il est possible de répéter. Jusqu'à maintenant, plus de 40 espèces de plantes différentes ont été modifiées génétiquement à l'aide d'ADN étranger (Charest et Michel, 1992), et ce nombre augmente constamment. Il serait possible, dans l'avenir, de mettre au point des techniques permettant l'introduction de chromosomes entiers. Ce n'est pas la même chose que de transférer un génome au complet, mais cela permettrait de conserver certains des gènes qui seraient autrement perdus.

Chapitre V CONCLUSION

Le présent rapport veut faire ressortir la nécessité d'intégrer des approches *ex situ* et *in situ* dans l'élaboration d'un programme global de conservation de la diversité génétique et d'examiner les avantages de l'éventail de méthodes disponibles, comme le montre le tableau 8. Si elles sont utilisées judicieusement, les méthodes étudiées devraient contribuer de façon significative à la conservation de ressources génétiques précieuses des plantes ligneuses vivaces.

L'élaboration de techniques de mise en culture et de cryopréservation pour les semences du type récalcitrant, le perfectionnement de la culture de tissus *in vitro* et conservation de semences artificielles, qui comportent tous une étape de séchage des graines pour que leur teneur en eau soit comparable à celle des semences du type orthodoxe séchées en vue de leur stockage, sont nécessaires pour améliorer ces méthodes afin de répondre aux besoins en matière de conservation à moyen et à long termes. Les recherches sur la culture de tissus devraient être étendues à l'élaboration de protocoles fondamentaux pour la propagation d'un éventail d'espèces non commerciales et centrées sur la mise au point de méthodes de préservation peu coûteuses.

Lorsqu'on évalue l'efficacité et les limites des méthodes *ex situ* actuellement disponibles pour la conservation génétique d'espèces ligneuses vivaces, il devient évident que, dans l'état actuel des connaissances, conservation de pollen, conservation de semences du type récalcitrant et la culture *in vitro* ne sont viables que comme mesure à court terme. La seule méthode de conservation *ex situ* à moyen terme pouvant être actuellement utilisée sur une grande échelle en exploitation forestière est la conservation de semences du type orthodoxe. Celles-ci peuvent généralement être également conservées à long terme, au moyen de la cryopréservation. Dans tous ces cas, cependant, les problèmes liés à la régénération des lots de semences mentionnés plus haut ne doivent pas être négligés. Le stockage peut ne pas être en soi le problème le plus difficile dans les stratégies de conservation *ex situ* à long terme.

TABLEAU 8.

Comparaison des méthodes de conservation *in situ* et *ex situ*

| Stratégie de Conservation | Avantages: | Désavantages/Difficultés |
|--|--|--|
| <p><i>In situ</i> Aires protégées et zones à ressources gérées</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Préserve les ressources génétiques dans leur habitat naturel, maintient les interactions avec d'autres espèces et organismes; - La conservation de la variété intraspécifique peut être combinée à divers degrés avec la conservation de la variété interspécifique; - Applicable aux espèces ayant des semences de types orthodoxe et récalcitrant, et à des espèces se multipliant végétativement. | <ul style="list-style-type: none"> - L'espace nécessaire; - Les ressources sont sujettes à disparaître par accident ou à cause d'insectes nuisibles ou de maladies; - Un réseau de zones de conservation séparées les unes des autres est nécessaire pour tenir compte de la variation des espèces cibles selon la provenance (clinale, géographique); - On a besoin de renseignements sur la sylviculture, et des interventions des gestionnaires sont nécessaires pour répondre à des objectifs donnés en matière de conservation. |
| <p><i>Ex situ</i> Banques de semences</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Les propagules sont facilement utilisables; - Travail minimal; nécessite peu d'espace (petites graines); - La variation liée à la provenance (clinale, géographique) peut être conservée pourvu que l'éventail d'espèces soit adéquatement échantillonné. | <ul style="list-style-type: none"> - Ne s'applique pas aux espèces ayant des semences de type récalcitrant ni aux espèces se multipliant végétativement; - L'espace nécessaire (graines volumineuses); - Ne conserve pas les espèces associées de l'écosystème; - La régénération régulière des lots de semences présente des problèmes parfois insurmontables. |
| <p><i>Ex situ</i> Banques de pollen</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Nécessite très peu d'espace; - Applicable aux espèces aux semences de types récalcitrant et orthodoxe; - La variation liée à la provenance (clinale, géographique) et la variation interspécifique et intraspécifique peuvent être conservées pourvu que l'éventail d'espèces soit adéquatement échantillonné. | <ul style="list-style-type: none"> - Seule la moitié du génome est conservée; - Le stockage du pollen tricellulaire est extrêmement difficile; - Nécessité de fleurs mâles pour la prolongation conventionnelle; - Les propagules ne sont pas faciles à obtenir; - Les espèces associées ne sont pas conservées. |

TABLEAU 8 suite

| Stratégie de Conservation | Avantages | Désavantages/Difficultés |
|---|--|--|
| <p><i>Ex situ</i> Banques de culture de tissus (voir <u>tableau 5</u>, p. 54-55, pour plus de renseignements)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Nécessite très peu d'espace; - L'érosion génétique est réduite si l'on se sert de méthodes telles que la cryopréservation; - Applicable aux espèces aux semences de types récalcitrant et orthodoxe et aux espèces qui se multiplient végétativement; - La variation liée à la provenance (clinale, géographique) et la variation interspécifique et intraspécifique peuvent être conservées pourvu que l'éventail d'espèces soit adéquatement échantillonné; - Conservation aseptique (minimise les risques de maladies); - Le temps nécessaire pour produire des propagules est réduit. | <ul style="list-style-type: none"> - Problèmes d'échantillonnage pour un arbre donné et d'échantillonnage d'un nombre adéquat d'arbres représentatifs; - Les procédés sont particuliers aux espèces, et parfois aux génotypes; - Problèmes de variation somaclonale et de maturation hâtive; - Les espèces associées ne sont pas conservées. |
| <p><i>Ex situ</i> Banques d'ADN</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Nécessite très peu d'espace, de grands nombres d'échantillons peuvent être manipulés; - Applicable aux espèces en voie d'extinction (ou déjà disparues); - Applicable à toutes sortes de plantes. | <ul style="list-style-type: none"> - Pour le moment, il est impossible d'introduire un génome entier dans un autre organisme vivant/une autre plante; - N'est pas en soi une méthode pratique de conservation du plasma germinatif; - Dernier recours. |
| <p><i>Ex situ</i> Banques de semis, peuplements de conservation <i>ex situ</i></p> | <ul style="list-style-type: none"> - Applicable aux espèces ayant des semences de types récalcitrant et orthodoxe; - La variation liée à la provenance (clinale, géographique) et la variation interspécifique et intraspécifique peuvent être conservées pourvu que l'éventail d'espèces soit adéquatement échantillonné. | <ul style="list-style-type: none"> - Espace nécessaire; - Nécessite une isolation spatiale pour conserver l'identité selon la provenance; - Les espèces associées ne sont pas conservées; - N'est généralement pas la meilleure solution pour les espèces aux semences du type orthodoxe, ou pour celles sans valeur socio-économique réelle, pour des considérations économiques. |

TABLEAU 8 suite

| Stratégie de Conservation | Avantages | Désavantages/Difficultés |
|------------------------------|--|--|
| <i>Ex situ</i> Arboretums | <ul style="list-style-type: none"> - Applicable aux espèces ayant des semences de types récalcitrant et orthodoxe et aux espèces qui se multiplient végétativement; - La variation liée à la provenance (clinale, géographique) et la variation interspécifique et intraspécifique peuvent être conservées pourvu que l'éventail d'espèces soit adéquatement échantillonné; - Méthode utile pour les phénotypes/ géotypes uniques (par ex. les mutants, variants, arbres stériles). | <ul style="list-style-type: none"> - L'espace nécessaire; - Les ressources sont sujettes à disparaître par accident ou à cause d'insectes nuisibles ou de maladies; - Les espèces associées ne sont pas conservées; - Ne convient pas à la conservation de la variation liée à la provenance (clinale, géographique); - Exige un nombre minimum d'individus pour conserver la variation intraspécifique, par opposition à la variation interspécifique qui est généralement l'objet des arboretums. |

Les recherches futures devraient porter sur les domaines suivants :

1. L'élaboration de protocoles adéquats pour le tri et l'identification précise des espèces à semences du type véritablement récalcitrant. Pour cela, nous devrions examiner maintenant les taux de dessiccation par rapport aux taux subséquents de germination, accordant une attention particulière aux techniques de dessiccation ne comportant pas l'utilisation d'air chauffé.
2. Si les semences ne peuvent être séchées sans dommage, leur tolérance à la cryopréservation devrait être examinée. Ce procédé comportera l'évaluation des gradients de température des tissus dans le temps et dans l'espace, de la pénétration des cryoprotecteurs, de la possibilité d'utiliser des embryons excisés, et de la praticabilité des techniques de lyophilisation.
3. Pour améliorer l'efficacité de la cryopréservation, les effets de la température de conservation cryogénique et de la teneur en eau des semences sur la dormance provoquée devraient être étudiés.

4. Il faudrait examiner la teneur en eau optimale pour le stockage du pollen, le mode de dessiccation et de réhydratation, la température et l'atmosphère de stockage ainsi que la nécessité d'utiliser un cryoprotecteur, et le type du cryoprotecteur à utiliser.
5. Des améliorations devraient être apportées aux méthodes de stockage conventionnelles pour les semences du type récalcitrant à des températures ambiantes ou sous-ambiantes; on devrait notamment élaborer des moyens de contrôler les attaques microbiennes, inhiber la germination avec des produits chimiques et évaluer les besoins en oxygène.
6. Compte tenu du coût élevé de l'exploitation de banques de semences réfrigérées (un problème qui concerne particulièrement les pays en voie de développement), il est urgent de mettre au point des méthodes de stockage de semences ultra sèches à des températures ambiantes ou sous-ambiantes.
7. Il y aurait lieu d'envisager le recours à d'autres stratégies pour la conservation de semences du type récalcitrant, par exemple le développement des banques de semis, des peuplements de conservation *ex situ* et des vergers à graines.
8. Des méthodes de culture de tissus devraient être mises au point pour des espèces non commerciales. Il faudrait également déterminer les facteurs critiques liés au succès de la culture de tissus afin de permettre le transfert des techniques d'une espèce à l'autre.
9. Il devrait y avoir des procédés peu coûteux de culture de tissus pour les essences d'arbres qui conviennent à la conservation à long terme. L'exploration de processus naturels, par exemple la dessiccation de l'embryon zygotique au cours de la maturation des semences et sa reproduction *in vitro*, pourrait ouvrir la voie à des possibilités de conservation peu coûteux des semences artificielles.

RÉFÉRENCES

- Adams, R.P.; J.E. Adams 1992. Conservation of plant genes: DNA banking and *in vitro* biotechnology. Academic Press, New York, NY.
- Ahlgren, C.E.; Ahlgren, I.F. 1978. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5-needled pine species. *For. Sci.* 24: 100-102.
- Ahuia, M.R. 1986. Storage of forest tree germplasm in liquid nitrogen (-196°C). *Silvae Genet.* 35:249-251.
- Akihama, T.; Omura, M. 1986. Preservation of fruit tree pollen. *In* Bajaj, Y.P.S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 1: Trees I.* Springer-Verlag, Berlin.
- Akihama, T.; Omura, M.; Kozalki, I. 1978. Further investigation of freeze-drying for deciduous fruit tree pollen. Page 1-7 *in* Akihama, T.; Nakajima, K., eds. *Long term preservation of favorable germplasm in arboreal crops.* Fruit Tree Research Station. Min. Agric. For. Ibaraki-ken, Japan.
- Akihama, T.; Omura, M.; Kozaki, I. 1980. Long term storage of fruit tree pollen and its application in breeding. *Farming Japan* 14:53-56.
- Alexander, M.P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol.* 55: 13-18.
- Alexander, M.P.; Ganeshan, S. 1990. Electromagnetic field-induced *in vitro* pollen germination and tube growth. *Curr. Sci.* 59: 276-277.
- Allen, G.S. 1957. Storage behaviour of conifer seeds in sealed containers held at 0°F, 32°F, and room temperature. *J. For.* 55:278-281.
- Ammirato, P.V. 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. *IAPTC Newsletter* 57:2-16.
- Ammirato, P.V.; Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Yamada, Y. 1984. *Handbook of plant cell culture. Vol. 3: Crop species.* Macmillan, New York, NY.
- Ammirato, P.V.; Evans, D.R.; Sharp, W.R.; Bajaj, Y.P.S. 1990. *Handbook of plant cell culture. Vol. 5: Ornamental species.* McGraw-Hill, Toronto, Ont.
- Andreica, A.; Sparchez, C.; Soran, V. 1988. Germination of wheat pollen under normal and cryopreservation conditions. *Stud. Cercet. Biol. Ser. Biol. Veg.* 40: 55-58.
- Ang, B.B. 1976. Problems of rubber seed storage. Pages 117-122 *in* Chin, H.F. *et al.*, eds. *Seed technology in the tropics.* Univ. Pertanian Malaysia, Kuala Lumpur.

- Ashwood-Smith, M.J.; Friedman, J.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.
- Bajaj, Y.P.S. 1976. Gene preservation through freeze-storage of plant cells, tissue and organ culture. *Acta Hort.* 63:63,75.
- Barnabas, B.; Fridvalszky, L. 1984. Adhesion and germination of differently treated maize pollen grains on the stigma. *Acta Bot. Hung.*, 30: 329-332.
- Barnabas, B.; Rajki, E. 1981. Fertility of deep-frozen maize (*Zea mays* L.) pollen. *Ann. Bot.* 48: 861-864.
- Barnett, J.P.; Vozzo, J.A. 1985. Viability and vigor of slash and shortleaf pine seeds after 50 years of storage. *For. Sci.* 31: 31 6-320.
- Barton, L.V. 1954. Storage and packaging of seeds of Douglas-fir and western hemlock. *Contri. Boyce Thompson Inst.* 18:25-37.
- Barton, L.V. 1961. Seed preservation and longevity. Leonard Hill Book Ltd., London, U.K.
- Benson, E.E.; Harding, K. 1991. The control by cryopreservation of age-related changes in plant tissue cultures. *In Durzan, D.J., et al., eds. Advanced study on molecular basis of plant aging.* Plenum Press. New York, NY.
- Benson, E.E.; Withers, L.A. 1988. The application of germplasm storage in biotechnology Pages 431-444 *in Pais, M.S.S., et al. Plant Cell Biotechnology.* Nato AS1 Series. Springer-Verlag. New York, NY.
- Berjak, P.; Farrant, J.M.; Mycock, D.J.; Pammenter, N.W. 1990. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation sensitivity. *Seed Sci. Technol.* 18:297-310.
- Bewley, J.D.; Black, M. 1978. Physiology and biochemistry of seeds. Springer-Verlag, New York, NY.
- Binns, A.N. 1981. Developmental variation in plant tissue culture. *Environ. Exp. Bot.* 21:325-332.
- Biondi, S. 1986. Practical applications of *in vitro* propagation: present situation and future prospects. *Giorn. Bot. Ital.* 120:29-42.
- Boland, D.J. 1986. Testing and storage of Eucalyptus and Acacia seed. Pages 75-93 *in Ayling, R.D.; Seward, B.R.T., eds. Proc., Workshop on seed handling and eucalypt taxonomy.* Harare, Zimbabwe, July 8-12, 1985. Forestry Commission of Zimbabwe/IDRC, Nairobi, Kenya.

- Bonga, J.M.; Durzan, D.J. 1987a. Cell and tissue culture in forestry: Vol. 1, General principles and biotechnology. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands.
- Bonga, J.M.; Durzan, D.J. 1987b. Cell and tissue culture in forestry: Vol. 2, Specific principles and methods: growth and developments. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands.
- Bonga, J.M.; Durzan, D.J. 1987c. Cell and tissue culture in forestry: Vol. 3, Case histories: gymnosperms, angiosperms and palms. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands.
- Bonga, J.M.; VonAderkas, P. 1993. Rejuvenation of tissues from mature conifers for clonal propagation *in vitro*. Pages 182-199 in Ahuja, M.R.; Libby, W.Y., eds. Clonal forestry I. Genetics and biotechnology. Springer-Verlag, New York, NY.
- Bonner, F.T. 1973. Storing red oak acorns. Tree Plant. Notes 24(3):12-13.
- Bonner, F.T. 1987. Collection and care of sweet gum seed. New Forests 3: 207-214.
- Bonner, F.T. 1990. Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. For. Ecol. Manage. 35:35-43.
- Bonner, F.T.; Vozzo, J.A. 1987. Seed biology and technology of *Quercus*. General Tech. Rep. SO-66, USDA Forest Serv., South. For. Exp. Sta., New Orleans, LA.
- Bramlett, D.L.; Matthews, F.R. 1991. Storing loblolly pine pollen. South. J. Appl. For. 15: 153-157.
- Brewbaker, J.L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. Amer. J. Bot. 54: 1069-1083.
- Brown, H.T.; Escombe, F. 1897. Note on the influence of very low temperatures on germination power of seeds. Proc. Royal Soc. 57:160.
- Caffrey, M.; Werner, B.G.; Priestley, D.A. 1987. A crystalline lipid phase in a dry biological system: evidence from X-ray diffraction analysis of *Typha latifolia* pollen. Biochim. Biophys. Acta 921:124-134.
- Callahan, R.Z. 1967. Hybridizing pines with diluted pollen. Silvae Genet. 16: 121-125.
- Carl, C.M., Jr. 1976. Effect of separation in n-pentane on storability of sugar maple seeds. Res. Note NE-218, USDA Forest Serv. Northeast. For. Exp. Sta., Broomhall, PA.

- Caron, G.E.; Wang, B.S.P.; Schooley, H.O. 1989. Effect of tree spacing, cone storage, and chilling on germination of *Picea glauca* seed. *For. Chron.* 66:388-392.
- Caron, G.E.; Wang, B.S.P.; Schooley, H.O. 1993. Variation in *Picea glauca* seed germination associated with the year of cone collection. *Can. J. For. Res.* (In press).
- Carpenter, J.; Crowe, J. 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiol.* 25: 244-255.
- Cauneau-Pigot, A. 1988. Biopalynological study of *Lapageria rosea* and *Iris unguicularis*: storage of pollen. *Grana* 27: 297-312.
- Charest, P.J.; Michel, M.F. 1992. Les fondements du génie phytogénétique et applications possibles aux essences forestières. Institut forestier national de Petawawa, Chalk River, Ont. Rapp d'inf. PI-X-104F.
- Cheng, H.Y.; Zheng, G.H.; Tao, K.L. 1990. Effects of ultradrying on aging, cell ultrastructure, and vigour of Chinese cabbage seed. *Plant Genetic Resources Newsletter* 83/84:9-14.
- Chin, H.F. 1975. Germination and storage of rambutan (*Nephelium lappaceum*) seeds. *Malaysian Agric. Res.* 4:173-180.
- Chin, H.F. 1978. Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics: seed problems. *Acta Hortic.* (Wageningen) 83:17-21.
- Chin, H.F.; Roberts, E.H. (eds). 1980. Recalcitrant crop seeds. Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Chin, H.F. 1988a. Recalcitrant seeds. A Status report. IBPGR, Rome.
- Chin, H.F. 1988b. Recalcitrant seeds: techniques for conservation. Pages 249-254 in Suzuki, S., ed. *Crop genetic resources of East Asia: Proceedings of the Intl. Workshop on Crop Genetic Resources of East Asia, November 10-13, 1987, Tsukuba, Japan.* IBPGR, Rome.
- Chin, H.F.; Aziz, M.; Ang, B.B.; Hamzah, S. 1981. The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. *Seed Sci. Technol.* 9:411-422.
- Ching, T.M.; Ching, K.K. 1964. Freeze-drying pine pollen. *Plant Physiol.* 39: 705.
- Ching, T.M.; Ching, K.K. 1976. Rapid viability tests and aging study of some coniferous pollen. *Can. J. For. Res.* 6: 516-522.
- Ching, T.M.; Slabaugh, W.H. 1966. X-ray diffraction analysis of ice crystals in coniferous pollen. *Cryobiology* 2: 321.

- Côme, D. & Corbineau, F. (1992). Chapitre "Les semences et le froid" dans "Les végétaux et le froid", Herman, Paris, 401-461.
- Copes, D.L. 1985. Fertility of douglas-fir pollen after one year of storage in liquid nitrogen. *For. Sci.* 31: 569-574.
- Cramarty, A.S.; Ellis, R.H.; Roberts, E.H. 1982. The design of seed storage facilities for genetic conservation. AGPG: IBPGR/82/23, Rome.
- Crisp, P.; Grout, B.W.W. 1984. Storage of broccoli pollen in liquid nitrogen. *Euphytica* 33: 819-823.
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Hoekstra, F.A.; Wistrom C.A. 1989a. Effects of water on the stability of phospholipid bilayers: The problem of imbibition damage in dry organisms. Pages 1-14 *in* Crop Sci. Soc. Am. Special publication, No. 14.
- Crowe, J.H.; Hoekstra, F.A.; Crowe, L.M.; Anchooguy, T.J.; Drobnis, E. 1989b. Lipid phase transitions measured in intact cells with fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*. 26:76-84.
- Cullis, C.A. 1981. Environmental induction of heritable changes in flax: defined environments inducing changes in rDNA and peroxidase isozyme band pattern. *Heredity* 47:87-94.
- Curtis, H. 1983. *Biology*. Worth Publishers Inc., New York, USA.
- Davies, M.D.; Dickinson, D.B. 1971. Effects of freeze-drying on permeability and respiration of germinating lily pollen. *Physiol. Plant.* 24: 5-9.
- De Boucaud, M.T.; Cambecedes, J. 1988. The use of 1,2-propanediol for cryopreservation of recalcitrant seeds: The model case of *Zea mays* imbibed seeds. *Cryo-Letters* 9:94-101.
- De Boucaud, M.T.; Brison, M.; Lédoux, C.; Germain, E.; Lutz, A. 1991. Cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant seed: *Juglans regia* L. cv Franquette. *Cryo-Letters* 12: 163-166.
- De Klerk, G.J. 1990. How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.* 39:129-144.
- Dereuddre, J.; Gazeau, C. 1986. La résistance naturelle au gel chez les végétaux. *Bull. Soc. Bot. Fr, Actual. Bot.* 133: 7-25.
- Dereuddre, J.; Kartha, K.; Gazeau, C. 1986. Cryoconservation des méristèmes. *Bull. Soc. Bot. Fr., Actual. Bot.* 133:75-88.
- Dereuddre, J.; Tannoury, M.; Hassen, N.; Kaminski, M.; Vintejou, C. 1992. Application de la technique d'enrobage à la congélation d'embryons

- somatiques de carotte (*Daucus carota* L.) dans l'azote liquide: étude cytologique. Bull. Soc. Bot. Fr. 139:15-33.
- DeVerno, L.L.; Charest, P.J.; Bonen, L. 1992. Mitochondrial DNA variation in somatic embryogenic cultures of *Larix x eurolepis*. Plant Cell. Rep. (submitted).
- Dickie, J.B.; Ellis, R.H.; Krask, H.L.; Ryder, K.; Tompsett, P.B. 1990. Temperature and seed storage longevity. Ann. Bot. 65:197-204.
- Dietze, W. 1973. Gefriertrocknung und lagerung von pollen verschiedener waldbaumarten. Silvae Gen. 22: 154-162.
- Doran, J.C.; Turnbull, J.W.; Boland, D.J.; Gunn, B.V. 1983. Handbook on seed of dry-zone acacias. FAO, Rome.
- Edwards, P.B.; Wanjura, W.J.; Brown, W.V. 1990. Mosaic resistance in plants. Nature 347:434.
- Eliason, E.J.; Heit, C.E. 1973. Red pine seed shows high germination after 42 years in storage. J. For. 71: 776.
- Ellis, R.H.; Hong, T.D.; Roberts, E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? J. Exp. Bot. 41:1167-1174.
- Ellis, R.H.; Roberts, E.H. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. Ann. Bot. 45:13-30.
- Engelmann, F. 1990. Conservation *in vitro* of forest tree genetic resources. In Proc. Training course Mgmt. Forest Genetic Resources and Agroforestry. Bogor, Indonesia.
- Engelmann, F. 1991. Tropical plant germplasm conservation. in Proc. 4th Conf. Intl. Plant Biotechnol. Network (IPBNet)-Biotechnology for tropical crop improvement in Latin America. San Jose, Costa Rica.
- Engstrom, A. 1966. Will deep freeze damage tree seed? Tree Planters' Notes 77:28-29.
- Evans, D.A. 1989. Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications. Trends Genet. 5:46-50.
- Evans, D.A.; Sharp, W.R. 1988. Somaclonal variation and its application in plant breeding. IAPTC Newsletter 54:2-19.
- Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. 1986. Handbook of plant cell culture: Vol. 4. Techniques and applications. Macmillan Publishing Co., New York.
- Evans, H. 1953. Results of some experiments on the preservation of cacao seed in a viable condition. Tropical Agriculture (Thailand) 27:48-55.

- FAO. 1984. Terre, vivres et population. Collection FAO: Développement économique et social 30, Rome.
- FAO. 1985. Rapport de la cinquième session de groupe d'experts des ressources génétiques forestières. FO: FGR/5/REP.F. FAO, Rome.
- FAO. 1989a. Ressources phytogénétiques. FAO, Rome.
- FAO. 1989b. Rapport de la septième session du groupe FAO d'experts des ressources génétiques forestières. FO: FGR/7/Rep.F. FAO, Rome.
- Farmer, R.E.; Hall, G.C. 1975. *In vitro* testing and long term storage of black cherry pollen. Pages 19-23 in Proc. 22nd Northeast. Forest Tree Improv. Conf., State Univ. New York.
- Farrant, J.M.; Pammenter, N.W.; Berjak, P. 1988. Recalcitrance - a current assessment. Seed Sci. Technol. 16:155-166.
- Ford-Lloyd, B.V.; Jackson, M.T. 1991. Biotechnology and methods of conservation of plant genetic resources. J. Biotechnol. 17:247-256.
- Foster, F.S.; Bridgewater, F. 1979. Viability tests to evaluate pollen reliability in loblolly pine controlled pollinations. Forest Sci. 25: 270-274.
- Fu, W. 1951. Germination and storage of trifoliolate orange seeds. California Citrograph 37:38.
- Ganeshan, S. 1986a. Viability and fertilizing capacity of onion pollen *Allium cepa* stored in liquid nitrogen. Trop. Agric. 63: 46-48.
- Ganeshan, S. 1986b. Cryogenic preservation of papaya pollen. Scientia Horticulturae 28: 65-70.
- Gardener, R.C.B. 1937. Storage of acorns. Quarterly J. For. 31:32-33.
- Gazeau, C.M. 1980. Accroissement de la résistance au froid (jusqu'à -30°C) de plantules de Blé avec un milieu cryoprotecteur. Effets de ce traitement sur les ultrastructures de cellules parenchymateuses d'ébauches foliaires. Can. J. Bot. 58:2520-2530.
- George, E.F.; Puttock, D.J.M.; George, H.J. 1987. Plant culture media: Vol. 1. Formulations and uses. Exegetics Ltd., Edington, U.K.
- George, E.F.; Puttock, D.J.M.; George, H.J. 1988. Plant culture media: Vol. 2. Commentary and analysis. Exegetics Ltd., Edington, U.K.
- Giannasi, D.E. 1992. Feasibility of obtaining gene sequence data from preserved and fossil materials. Pages 75-98 in Adams, R.P.; Adams, J.E. Conservation of plant genes: DNA banking and *in vitro* biotechnology. Academic Press, New York, NY.

- Gilissen, L.J.W. 1977. The influence of relative humidity on the swelling of pollen grains *in vitro*. *Planta* 137: 299-301.
- Goddard, R.E.; Matthews, F.R. 1981. Pollen Testing. Pages 40-43 in E. Carlyle-Franklin, ed. *Pollen Management Handbook*, USDA Forest Service, Agriculture Handbook No. 587.
- Gonzalez-Benito, M.E.; Perez-Ruiz, C. 1992. Cryopreservation of *Quercus faginea* embryonic axes. *Cryobiology* 29: 685-690.
- Grant, B.W.W. 1979. Low temperature storage of imbibed tomato seeds: a model for recalcitrant seed storage. *Cryo-Letters* 1:71-76.
- Grant, B.W.W.; Shelton, K.; Pritchard, H.W. 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann. Bot.* 52:381-384.
- Grzeskowiak, H.; Miara, B.; Suszka, B. 1983. Long term storage of seeds of Rosaceae species used as rootstock for cherry, plum, apple, and pear cultivars. *Arbor. Kornickie* 28:283-320.
- Hall, G.C.; Farmer, R.E. Jr. 1971. *In vitro* germination of black walnut pollen. *Can. J. Bot.* 49: 799-802.
- Harding, K. 1991. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55: 141-146.
- Harrington, J.F. 1972. Seed storage and longevity. Pages 145-240 in Kozłowski, T.T., ed. *Seed biology*, Vol. 3. Academic Press, New York.
- Hauhold, A.; Stanwood, P.C. 1985. Long term preservation of hop *Humulus lupulus* pollen in liquid nitrogen. *Crop. Sci.* 25:194-196.
- Hawkes, J.G. 1980. Genetic conservation of "recalcitrant species" an overview. Pages 83-92 in Withers, L.A.; Williams, J.T., eds. *Crop genetic resources. The conservation of difficult material*. Intl. Union. Biol. Sci., Paris.
- Hecker, R.J.; Stanwood, P.C.; Soulis, C.A. 1986. Storage of sugar beet pollen. *Euphytica* 35: 777-783.
- Heckly, R.J. 1978. Effects of oxygen on dried organisms. Page 257 in Crowe, J.H.; Clegg, J.S., eds. *Dry Biological Systems*. Academic Press, New York.
- Heit, C.E. 1967a. Propagation from seed. Part 10: Storage methods for conifer seeds. *Am. Nurseryman* 126:14-15, 38-54.
- Heit, C.E. 1967b. Propagation from seed. Part II. Storage of deciduous tree and shrub seeds. *Am. Nurseryman* 126:12-13, 86-94.

- Heslop-Harrison, J. 1979. An interpretation of the hydrodynamics of pollen. *Am. J. Bot.* 66: 737-743.
- Heslop-Harrison, J.; Heslop-Harrison, Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of furoxycarboxylic diacetate. *Stain Technol.* 45: 115-120.
- Heslop-Harrison, J.; Heslop-Harrison, Y.; Shivanna, K.R. 1984. The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor. Appl. Genet.* 67: 367-375.
- Hodgkin, T.; Lyon, G.D. 1986. The effect of *Brassica oleracea* extracts on the germination of *B. oleracea* pollen in thin layer chromatographic bioassay. *J. Exp. Bot.* 37: 406-411.
- Hoekstra, F.A. 1979. Mitochondrial development and activity of binucleate and trinucleate pollen during germination *in vitro*. *Planta* 145: 25-36.
- Hoekstra, F.A.; Bruinsma, J. 1975a. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. *Physiol. Plant.* 34: 221-225.
- Hoekstra, F.A.; Bruinsma, J. 1975b. Viability of Compositae pollen: Germination *in vitro* and influences of climatic conditions during dehiscence. *Z. Pflanzenphysiol.* 76: 36-43.
- Hoekstra, F.A.; Bruinsma, J. 1980. Control of respiration of binucleate and trinucleate pollen under humid conditions. *Physiol. Plant.* 48: 71-77.
- Hoekstra, F.A.; van der Wal, E.W. 1988. Initial moisture content and temperature of imbibition determine extent of imbibitional injury in pollen. *J. Plant Physiol.* 133: 257-262.
- Holman, R.M.; Brubaker, F. 1926. On the longevity of pollen. *Univ. Calif., Publ. Bot.* 13: 179-204.
- Holmes, G.D.; Buszewicz, G. 1958. The storage of seed of temperate forest tree species. *For. Abstracts* 19:313-322; 19:455-475.
- Honjo, H.; Nakagawa, Y. 1978. Suitable temperature and seed moisture content for maintaining the germinability of citrus seed for long term storage. Pages 31-35 *in* Akihima, T.; Nakajima, K., eds. Long term preservation of favourable germplasm in arboreal crops. Forest Tree Research Station, M.A.F., Japan.
- IBPGR. 1976. Report of IBPGR Working group on engineering, design and cost aspects of long term seed storage facilities. Intl. Board for Plant Genet. Resources Secretariat, Rome.

- IBPGR. 1982. Report of the first meeting of the IBPGR ad hoc advisory committee on seed storage. Intl. Board for Plant Genet. Resources Secretariat, Rome.
- IBPGR. 1983. IBPGR Ad-hoc Advisory Committee on Seed Storage. Report of Second Meeting. IBPGR, Rome.
- Ichikawa, S.; Shidei, T. 1972a. Fundamental studies on deep-freezing storage of tree pollen. *Bull. Kyoto Univ. For.* 42: 51.
- Johri, B.M.; Vasil, I.K. 1961. The physiology of pollen. *Bot. Rev.* 27: 325-337.
- Jones, L. 1967. Effect of storage at various moisture contents and temperatures on seed germination of silk oak, Australian pine, and *Eucalyptus* spp. USDA For. Serv., Southeast. For. Exp. Sta., Asheville, NC. Res. Note SE-83.
- Jorgensen, J. 1990. Conservation of valuable gene resources by cryopreservation in some forest tree species. *J. Plant Physiol.* 136: 373-376.
- Karp, A. 1989. Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? *IAPTC Newsletter* 58:2-11.
- Karp, A.; Bright, S.W.J. 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell. Biol.* 2:199-234.
- Kartha, K.K. 1985a. Cryopreservation of plant cell and organs. *IAPTC Newsletter* 45:2-15.
- Kartha, K.K. 1985b. Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Kartha, K.K.; Gamborg, O.L. 1978. Meristem culture techniques in the production of disease free plants and freeze preservation of germplasm of tropical tuber crops and grain legumes. Pages 263-283 *in* Diseases of tropical food crops. H, Marite and J.A. Meyer, eds. Université Catholique, Louvain, Belgium.
- Kaurin, Å.; Stushnoff, C. 1985. Influence of dimethyl sulfoxide on freezing resistance of lettuce seeds. *Cryobiology* 22:569-573.
- Keiding, H. 1985. Teak, *Tectona grandis* Linn. DANIDA Forest Seed Centre, Humleback, Denmark, Seed Leaflet 4.
- King, J.R. 1960. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. *Stain Technol.* 35: 225-227.
- King, M.W.; Roberts, E.H. 1980. A strategy for future research into the storage of recalcitrant seeds. Pages 90-104 *in* Chin, H.F.; Roberts, E.H., eds. Recalcitrant crop seeds. Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia.

- King, M.W.; Roberts, E.H. 1979. The storage of recalcitrant seeds - achievements and possible approaches. Intl. Board for Plant Genet. Resources Secretariat, Rome.
- King, M.W.; Roberts, E.H. 1980a. Maintenance of recalcitrant seeds in storage. Pages 53-79 in Chin, H.F.; Roberts, E.H. eds. Recalcitrant crop seeds. Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia.
- King, M.W.; Soetisna, U.; Roberts, E.H. 1981. The dry storage of Citrus seeds. Ann. Bot. 48:865-872.
- Knowlton, H.E. 1922. Studies in pollen, with special reference to longevity. Cornell Agr. Exp. Stn. Mem. 52: 751-793.
- Koopowitz, H.; Voss, R.; O'Neil, C. 1984. Long term storage of *Gladiolus* pollen. Hortscience 19: 513-514.
- Kühlwein, H.; Anhaeusser, H. 1951. Veränderungen des Gymnospermenpollens durch Lagerung. Planta 39: 476-479.
- Langis, R.; Schnabel, B.; Earle, E.A.; Steponkus, P.L. 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspension by vitrification. Cryo-Letters 10:421-428.
- Langis, R.; Steponkus, P.L. 1990. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. Plant Physiol. 92:666-671.
- Large, J.R.; Fernholz, D.F.; Merrill, S., Jr.; Potter, G.F. 1947. Longevity of tung seed as affected by storage temperatures. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 49:147-150.
- Larkin, P.J. 1987. Somaclonal variation: history, method, and meaning. Iowa State J. Res. 61:393-434.
- Larkin, P.J.; Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
- Lawrence, G.H.M. 1968. Taxonomy of vascular plants. Macmillan Co., New York, NY.
- Lecouteux, C.; Florin, B.; Tessereau, H.; Bollon, H.; Pteiard, V. 1991. Cryopreservation of carrot somatic embryos using a simplified freezing process. Cryo-Letters 12:319-328.
- Lee, C.W.; Thomas, J.C.; Buchmann, S.L. 1985. Factors affecting *in vitro* germination and storage of *Jobba simmondsia-chinensis* pollen. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 110:671-676.

- Lehninger, A.L. 1982. Principles of biochemistry. Worth Publishers Inc., New York, NY.
- Leon, J. 1974. Coffee (*coffea*) spp. In Handbook of plant introduction in tropical crops. Plant Protection Div., FAO, Rome.
- Livingston, G.K.; Ching, K.K. 1967. The longevity and fertility of freeze-dried Douglas-fir pollen. *Silvae Genet.* 16: 98.
- MacFarlane, D.R.; Forsyth, M. 1990. Recent insights on the role of cryoprotective agents in vitrification. *Cryobiology* 27:345-358.
- Marx, J.L. 1984. Instability in plants and the ghost of Lamarck. *Science* 224:1415-1416.
- Mäkinen, Y.; Brewbaker, J.L. 1967. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. I. Diffusion of enzymes out of intact pollen grains. *Physiol. Plant.* 20:477-482.
- Mattich, J.S.; Ablett, E.M.; Edmonson, D.L. 1992. The gene library - preservation and analysis of genetic diversity in Australasia. Pages 15-35 in Adams, R.P.; Adams, J.E. Conservation of plant genes. Academic Press, New York, NY.
- McKersie, B.D.; Seneratna, T.; Bowley, S.R.; Brown, D.C.W.; Krocho, J.E.; Bentley, J.D. 1989. Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25:1183-1188.
- Meryman, H.T. 1966. Review of biological freezing. Pages 1-114 in Meryman, H.T., ed. *Cryobiology*. Academic Press, New York, NY.
- Meryman, H.T.; Williams, R.J. 1985. Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation. Pages 13-47 in Kartha, K.K., ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Misson, J.P.; Giot-Wirgot, P. 1984. Rajeunissement d'un clone de *Thuja* en vue de sa multiplication *in vitro*. *Ann. Rech. Sylvioles AFOCEL* 187-197.
- Moody, W.R.; Jett, J.B. 1990. Effects of pollen viability and vigor on seed production of loblolly pine. *South. J. Appl. For.* 14: 33-38.
- Monteuuis, O. 1986. Microgreffage de points vegetatifs de *Sequoiadendron giganteum* Buchholz seculaires sur de jeunes semis cultivés *in vitro*. *CR Acad. Sci. Paris* 302:223-225.
- Muller, C. (1990) Problèmes posés par la conservation des glands. *Rev. For. Fr.* XLII:212-214.

- Muller, C.; Bonnet-Masimbert & Laroppe, E. (1990). Nouvelles voies dans le traitement des graines dormantes de certains feuillus: hêtre, frêne, merisier. *Revue Forestière Française*, XLII: 329-345.
- Mumford, P.M.; Grant, B.W.W. 1979. Desiccation and low temperature (-196°C) tolerance of Citrus limon seed. *Seed Sci. Technol.* 7:407-410.
- Namkoong, G. 1981. Methods of pollen sampling for gene conservation. Chapter 17 in Franklin, E.C., ed. *Pollen management handbook*. USDA Agric. Handb. 587.
- Nath, J.; Anderson, J.O. 1975. Effect of freezing and freeze-drying on the viability and storage of *Lilium longiflorum* L. and *Zea mays* L. pollen. *Cryobiology* 12: 81.
- Neihaus, W.G.J. 1978. A proposed role of superoxide anion as a biological nucleophil in the deesterification of phospholipids. *Bioorganic Chem.* 7: 77-84.
- Oberle, G.D.; Watson, R. 1953. The use of 2,3,5-triphenyl tatrazolum chloride in viability tests of fruit pollen. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 61:229-303.
- Ockendon, D.J.; Gates, P.J. 1976a. Variation in pollen viability in the onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 25: 753-759.
- Ockendon, D.J.; Gates, P.J. 1976b. Reduced pollen viability in the onion (*Allium cepa* L.). *New Phytol.* 76: 511-517.
- Orton, T.J. 1983. Experimental approaches to the study of somaclonal variation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:67-76.
- Orton, T.J. 1984. Genetic variation in somatic tissues: method or madness. *Adv. Plant Pathol.* 2:153-189.
- Ottaviano, E.; Mulcahy, D.L. 1989. Genetics of angiosperm pollen. *Advances in Genetics* 26: 1-64.
- Owens, J.N.; Blake, M.D. 1986. Production de semences forestières: revue bibliographique et suggestions de recherche. Institut forestier national de Petawawa. *Rapp. d'inf. PI-X-53F*.
- Pääbo, S.; Higuchi, R.G.; Wilson, A.C. 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 264:9709-9712.
- Pallais, N.; Malagamba, P.; Fong, N.; Garcia, R.; Schmediche, P. 1986. Pollen selection through storage: A tool for improving true potato seed quality? Pages 153-158 in Mulcahy, D.B., *et al.*, eds. *Biotechnology and ecology of pollen*. Springer, New York, NY.

- Palmberg, C. 1987. Conservation of genetic resources of woody species. *In* Simposio sobre silvicultura y mejaramiento genetico. Cief, Buenos Aires, April 6-10, 1987 (English translation).
- Panochit, J.; Wasuwanich, P.; Hellum, A.K. 1984. Collection, germination and storage of *Shorea siamensis* Miq. seeds. Embryon 1:1-13. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre, Muak lek, Saraburi, Thailand.
- Panochit, J.; Wasuwanich, P.; Hellum, A.K. 1986. Collection and storage of seeds of *Shorea roxburghii* D. Don. Embryon 2:62-67. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre, Muak lek, Saraburi, Thailand.
- Pausujja, R.; Granhof, J.; Willan, R.L. 1986. *Pinus merkusii* Jungh. & de Vriese (including *Pinus merkusiana* Cooling and Gausson). DANIDA Forest Seed Centre, Humleback, Denmark, Seed Leaflet. 7.
- Peacock, W.J. 1989. Molecular biology and genetic resources Pages 363-376 *in* Brown, A.H.D., *et al.*, eds. The use of plant genetic resources.
- Pence, V.C. 1990. Cryostorage of embryo axes of several large-seeded temperate tree species. Cryobiology 27: 212-218.
- Pence, V.C. 1992. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. Cryobiology 29: 391-399.
- Pierik, R.L.M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. IAPTC Newsletter 62:11-21.
- Poethig, S. 1989. Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. Trends Genet. 5:273-277.
- Poissonier, M.; Monod, V.; Paques, M.; Dereuddre, J. 1992. Cryoconservation dans l'azote liquide d'apex d'*Eucalyptus gunni* (Hook. F.) cultivé *in vitro* après ennobage et deshydratation. Ann. Afocel. 5-23.
- Pritchard, H.W.; Manger, K.R.; Prendergast, F.G. 1988. Changes in *Trifolium arvens* seed quality following alternating temperature treatment using liquid nitrogen. Ann. Bot. 62:1-11.
- Pritchard, H.W.; Prendergast, F.G. 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of embryos of recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. J. Exp. Bot. 37:1388-1397.
- Pyle, M.M.; Adams, R.P. 1989. *In situ* preservation of DNA in plant specimens. Taxon 38:576-581.
- Quinn, P.J. 1985. A lipid phase separation model of low temperature damage to biological membranes. Cryobiology 22: 128-146.

- Redenbaugh, K. 1990. Application of artificial seed to tropical crops. *Hortscience* 25:251-255.
- Redenbaugh, K.; Fujii, J.A.; Slade, D. 1988. Encapsulated plant embryos. Pages 225-248 *in* Mizrahi, A., ed. *Biotechnology in Agriculture*. Alan R. Liss, New York, NY.
- Redenbaugh, K.; Ruzin, S.E. 1989. Artificial seed production and forestry. Pages 57-71 *in* Dhawan, V., ed. *Applications of biotechnology in forestry and horticulture*. Plenum Press, New York, NY.
- Redenbaugh, K.; Viss, P.; Slade, D.; Fujii, J. 1987. Scale-up: artificial seeds. Pages 473-493 *in* Green, C., *et al.*, eds. *Plant tissue and cell culture*. Alan R. Liss, New York, NY.
- Reinert, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an geuebekulturen aus carrotten. *Naturwissenschaften* 45:344-345.
- Roberts, E.H. 1972. Storage environment and the control of viability. Pages 14-58 *in* Roberts, E.H., ed. *Viability of seeds*. Chapman and Hall, London.
- Roberts, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.* 63:53-63.
- Roberts, E.H.; Ellis, R.H. 1977. Prediction of seed longevity at sub-zero temperatures and genetic resources/conservation. *Nature* 268:431-433.
- Roberts, E.H.; Ellis, R.H. 1989. Water and seed survival. *Ann. Bot.* 63:39-52.
- Roberts, E.H.; King, M.W.; Ellis, R.H. 1984. Recalcitrant seeds, their recognition and storage. Pages 38-52 *in* Holden, J.H.W.; Williams, J.T. eds. *Crop genetic resources: conservation and evaluation*. Allen and Unwin, London, U.K.
- Roca, W.M.; Chavez, R.; Martin, M.L.; Arias, D.I.; Mafla, G.; Reyes, R. 1989. *In vitro* methods of germ-plasm conservation. *Genome* 31:813-817.
- Roche, L. (ed). 1975. Report on a pilot study on the methodology of conservation of forest genetic resources. FO: Misc./75/8. FAO, Rome.
- Rogers, S.O.; Bendick, .AJ. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5:69-76.
- Rollo, F.; Venanzi, F.M.; Amica, A. 1991. Nucleic acids in mummified plant seeds: biochemistry and molecular egenetics of pre-Columbian maize. *Genet. Res. Cambridge* 58:193-201.
- Roos, E.E. 1982. Induced genetic changes in seed germplasm during storage. Pages 409-434 *in* Khan, A.A., ed. *The physiology and biochemistry of seed development and germination*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.

- Rotman, B.; Papermaster, B.W. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. Proc. National Acad. Sci. USA 55: 134-141.
- Sack, F.D.; Leopold, A.C.; Hoekstra, F.A. 1988. Structural correlates of imbibitional injury in *Typha* pollen. Am. J. Bot. 75: 570-578.
- Sakai, A. 1984. Cryopreservation of apical meristems. Hortic. Rev. 6:357-372.
- Sakai, A. 1986. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In Bajaj, Y.P.S., ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.1 - Trees. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Sakai, A.; Kobayashi, S.; Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9:30-33.
- Sakai, A.; Sugawara, Y. 1978. Survival of plant germplasm in liquid nitrogen. Pages 345-359 in Plant cold hardiness and freezing stress. Vol. 1. Academic Press, New York, NY.
- Sasaki, S. 1976. The physiology, storage and germination of timber seeds. Pages 11-115 in Chin, H.F. et al., eds. Seed technology in the tropics. Univ. Pertanian Malaysia, Malaysia.
- Sasaki, S. 1980. Storage and germination of dipterocarp seeds. Malays. Forester 43:290-308.
- Schoenike, R.E.; and Bey, C.F. 1981. Conserving genes through pollen storage. In Franklin, E.C., ed. Pollen Management Handbook Ch. 16. USDA Agric. Handb. 587.
- Schürhoff, P.N. 1926. Die Zytologie der Blütenpflanzen. Enke Publ. Co., Stuttgart.
- Scowcroft, W.R. 1984. Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. IBPGR, Rome.
- Sharp, W.R.; Evans, D.A.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. 1984a. Handbook of plant cell culture: Vol. 1. Techniques for propagation and breeding. Macmillan, New York, NY.
- Sharp, W.R.; Evans, D.A.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. 1984b. Handbook of plant cell culture: Vol. 2. Crop Species. Macmillan New York, NY.
- Shea, G.M.; Armstrong, P.A. 1978. The effect of post-harvest environmental factors on the longevity of Hoop pine seed. Queensland Dep. For. Res. Note 24.

- Shi, S.X., Tian, Y. 1989. Fertility and viability of rye pollen after storage in liquid nitrogen for a year. *Acta Phytophysiol. Sin.* 15: 393-396.
- Shivanna, K.R. and Heslop-Harrison, J. 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* 47: 759-770.
- Simon, E.W. 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol.* 73: 377-420.
- Smith, R.D. 1992. Seed collecting and seed research programmes of the Royal Botanic Garden Kew in support of its objectives to further *ex situ* conservation of biological diversity. Paper presented at ICRAF Multipurpose Tree Germplasm Resources Centre Consultation, 2-5 June, 1992, Nairobi, Kenya.
- Spaeth, S.C. 1986. Imbibition stress and transverse cracking of beans, pea, and chickpea cotyledons. *Hortic. Sci.* 21:110-111.
- Stanley, R.G.; Linskens, H.F. 1974. *Pollen: Biology, Biochemistry, Management.* Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Stanwood, P.C. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. Pages 199-226 in Kartha, K.K. ed. *Cryopreservation of plant cells and organs.* CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Stanwood, P.C.; Bass, L.N. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci. Technol.* 9:423-437.
- Steward, F.C.; Mapes, M.O.; Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 445-705-708.
- Styles, E.D.; Burgess, J.M.; Mason, C.; Huber, B.M. 1982. Storage of seed in liquid nitrogen. *Cryobiology* 19:195-199.
- Surber, E.; Kälén, I.; Simonett, A.; Frehner, E. 1973. Freeze-drying of forest tree seeds, especially of spruce (*Picea abies* (L.) Karst). Paper No. 24, Proc. Int. Symp. Seed Processing, Bergen, Norway, 1973. Vol. I. Royal Coll. For., Stockholm.
- Suszka, B. 1975. Cold storage of already after-ripened beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Arbor. Kornickie* 20:299-315.
- Suszka, B.; Tylkowski, T. 1981. Storage of acorns of the English oak (*Quercus robur* L.) over 1-5 winters. *Arbor. Kornickie* 25:199-229.
- Suszka, B.; Tylkowski, T. 1982. Storage of acorns of the northern red oak (*Quercus borealis* Michx. = *Q. rubra* L.) over 1-5 winters. *Arbor. Kornickie* 26:253-306.

- Tang, H.T.; Tamari, C. 1973. Seed description and storage tests of some dipterocarps. *Malays. Forester* 36:38-53.
- Tauer, C.G. 1979. Seed tree, vacuum, and temperature effects on eastern cottonwood seed viability during extended storage. *For. Sci.* 25:112-114.
- Texeira, M.R. 1955. Chestnut storage trials. Report to the FAO of the United Nations No. FAO/CH/13-A, Paper 3e, Rome.
- Tompsett, P.B. 1982. The effect of desiccation on the longevity of seeds of *Araucaria hunsteinii* and *A. cunninghamii*. *Ann. Bot.* 50: 693-704.
- Tompsett, P.B. 1986. The effect of temperature and moisture content on the longevity of seed of *Ulmus carpinifolia* and *Terminalia brassii*. *Ann. Bot.* 57:875-883.
- Tompsett, P.B. 1987. A review of the literature on storage of dipterocarp seeds. Pages 348-365 in *Proc., Intl. Symp. Forest Seed Problems in Africa*. Dept. Forest Genetics, Swedish Univ. Agric. Sci., Umeå.
- Tompsett, P.B. 1989. Predicting the storage life of orthodox tropical forest tree seeds. Pages 93-98 in Turnbull, J.W. ed. *Tropical tree seed research*. ACIAR Proceedings No. 28. ACIAR, Canberra, Australia.
- Towill, L.E. 1985. Low temperature and freeze/vacuum-drying preservation of pollen. Pages 171-198 in Kartha, K.K., ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Towill, L.E. 1985. Low temperature and freeze/vacuum-drying preservation of pollen. Pages 171-198 in Kartha, K.K., ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Towill, L.E. 1990. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9:178-180.
- Tranvan, H.; David, A. 1985. Greffage *in vitro* du pin maritime (*Pinus pinaster*). *Can. J. Bot.* 63:1017-1020.
- Turnbull, J.W.; Martensz, P.N. 1982. Aspects of seed collection, storage and germination in Casuarinaceae. *Austral. For. Res.* 12:281-294.
- Tylkowski, T. 1976. Respiration of northern red oak (*Quercus bierleinii* Michx.) acorns. *Arbor. Kornickie* 21:313-322.
- Uragami, A.; Sakai, A.; Nagai, M.; Takahashi, T. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep.* 8:418-421.
- Vasil, I.K. 1962. Studies on Pollen storage of some crop plants. *J. Indian Bot. Soc.* 41: 178-196.

- Villiers, T.A. 1974. Seed aging: chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. *Plant Physiol.* 53:875-878.
- Villiers, T.A.; Edgcumbe, D.J. 1975. On the cause of deterioration in dry storage. *Seed Sci. Technol.* 3:761-774.
- Visser, T. 1955. Germination and storage of pollen. *Meded. Landbouwhogeschool [Wageningen]* 55: 1-68.
- von Arnold, S.; Wallin, A. 1988. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. *IAPTC Newsletter* 56:2-13.
- Vozzo, J.A. 1976. Effects of CO₂ storage atmospheres on viability of *Quercus nigra* acorns. Pages 175-178 in Proc. 2nd Intl. Symp. Physiol. Seed Germination, Oct. 18-30, 1976, Fuji, Japan. Government For. Exp. Stn., Fuji, Japan.
- Walbot, V. 1985. On the life strategies of plants and animals. *Trends Genet.* 1:165-169.
- Wang, B.S.P. 1971. The role of forest tree seed storage in gene conservation. Pages 25-29 in Fowler, D.P.; Yeatman, C.W., eds. Proc. Symp. Conservation of forest gene resources. 13th Mtg. Committee on Forest Tree Breed. Canada, Part 2. Can. For. Serv., Dep. Environ., Ottawa.
- Wang, B.S.P. 1974. Tree seed storage. Dept. Environ., Can. For. Serv. Publ. No. 1335.
- Wang, B.S.P. 1975. Stockage de semences d'arbre et de pollen en vue de la conservation génétique: possibilités et limitations. Pp. 99-107 dans *Méthodologie de la conservation des ressources génétiques forestières. Rapport sur une Etude Pilote.* FAO, Rome.
- Wang, B.S.P. 1982. Long term storage of *Abies*, *Betula*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, and *Populus* seeds. Pages 212-218 in Wang, B.S.P.; Pitel, J.A. compilers/eds. Proc. Intl. Symp. Forest Tree Seed Storage, September 23-27, 1980, Chalk River, Ontario, Canada. Environ. Can., Can. For. Serv., Ottawa.
- Wang, B.S.P.; Downie, B.; Wetzel, S.; Palamarek, D.; Hamilton, R. 1991. Effects of cone scorching on germinability, vigour, and seed extraction efficiency of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* Engelm.) seeds in Alberta. *Seed Sci. Technol.* 20: 409-419.
- Werbsuhn, G. 1990. On the genetic state of cells cultivated *in vitro*. *Biol. Zentralbl.* 109:345-350.
- Werbsuhn, G. 1989. Obtaining mutants from cell cultures. *Plant Breeding* 102: 1-9.

- White, T.J.; Arnheim, N.; Elrich, H.A. 1989. The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 5:185-189.
- Whitehead, R.A. 1965. Freeze-drying and room-temperature storage of coconut pollen. *Econ. Bot.* 19: 267.
- Withers, L.A. 1987. Long term preservation of plant cells, tissues and organs. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 4:221-272.
- Withers, L.A. 1989. *In vitro* conservation and germplasm utilization. Pages 309-334 in Brown, A.H.D., *et al.*, eds. The use of plant genetic resources. Cambridge Univ. Press, New York.
- Withers, L.A. 1990a. *In vitro* approaches to the conservation of plant genetic resources Pages 261-276 in Withers, L.A.; Alderson, P.G., eds. Plant tissue culture and its agricultural applications.
- Withers, L.A. 1990b. *In vitro* techniques for the conservation of crop germplasm. In Proc. National Conf. Plant and Animal Biotechnol. Nairobi, Kenya. IBPGR, Rome, Italy.
- Withers, L.A. 1990c. Tissue culture in the conservation of plant genetic resources In International Workshop on Tissue Culture for the Conservation of Biodiversity and Plant Genetic Resources, Kuala Lumpur, Malaysia. IBPGR, Rome, Italy.
- Withers, L.A. 1991. Maintenance of plant tissue culture. In Kirsop, B.E.; Doyle, A., eds. Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods. 2nd Ed. Academic Press, London.
- Withers, L.A. 1991. *In vitro* conservation. *Biol. J. Linnean Soc.* 43:31-42.
- Woessner, R.A., McNabb, K.L. 1979. Large scale production of *Gmelina arborea* Roxb. seed - a case study. *Commonwealth For. Rev.* 58:117-121.
- Yap, S.K.; Wong, S.M. 1983. Seed biology of *Acacia mangium*, *Albizia falcataria*, *Eucalyptus* spp. *Gmelina arborea*, *Maesopsis eminii*, *Pinus caribaea*, and *Tectona grandis*. *Malays. Forester* 46: 26-45
- Yeatman, C.W. 1987. Conservation of genetic resources within managed natural and man-made forests. *Malays. Forester* 50: 1-8.
- Zasada, J.C. 1977. Changes in seed viability during storage for selected Alaskan Salicaceae. *Seed Sci. Technol.* 5: 509-518.

CAHIERS TECHNIQUES DE LA FAO

ÉTUDES FAO: FORÊTS

- 1 Contrats d'exploitation forestière sur domaine public, 1977 (A E F)
- 2 Planification des routes forestières et des systèmes d'exploitation, 1977 (A E F)
- 3 Liste mondiale des écoles forestières, 1977 (A/E/F)
- 3 Rév. 1. Liste mondiale des écoles forestières, 1981 (A/E/F)
- 3 Rév. 2. Liste mondiale des écoles forestières, 1986 (A/E/F)
- 4/1 La demande, l'offre et le commerce de la pâte et du papier – Vol. 1, 1977 (A E F)
- 4/2 La demande, l'offre et le commerce de la pâte et du papier – Vol. 2, 1977 (A E F)
- 5 The marketing of tropical wood, 1976 (A E)
- 6 Manuel de planification des parcs nationaux, 1978 (A E** F)
- 7 Le rôle des forêts dans le développement des collectivités locales, 1978 (A Ar E F)
- 8 Les techniques des plantations forestières, 1979 (A* Ar C E F)
- 9 Wood chips – production, handling, transport, 1976 (A C E)
- 10/1 Estimation des coûts d'exploitation à partir d'inventaires forestiers en zones tropicales – 1. Principes et méthodologie, 1980 (A E F)
- 10/2 Estimation des coûts d'exploitation à partir d'inventaires forestiers en zones tropicales – 2. Recueil des données et calculs, 1980 (A E F)
- 11 Reboisement des savanes en Afrique, 1981 (A F)
- 12 China: forestry support for agriculture, 1978 (A)
- 13 Prix des produits forestiers 1960-1977, 1979 (A/E/F)
- 14 Mountain forest roads and harvesting, 1979 (A)
- 14 Rev. 1. Logging and transport in steep terrain, 1985 (A)
- 15 AGRIS foresterie – Catalogue mondial des services d'information et de documentation, 1979 (A/E/F)
- 16 Chine: industries intégrées du bois, 1980 (A E F)
- 17 Analyse économique des projets forestiers, 1980 (A E F)
- 17 Sup. 1. Economic analysis of forestry projects: case studies, 1979 (A E)
- 17 Sup. 2. Economic analysis of forestry projects: readings, 1980 (A C)
- 18 Prix des produits forestiers 1960-1978, 1980 (A/E/F)
- 19/1 Pulping and paper-making properties of fast-growing plantation wood species – Vol. 1, 1980 (A)
- 19/2 Pulping and paper-making properties of fast-growing plantation wood species – Vol. 2, 1980 (A)
- 20 Amélioration génétique des arbres forestiers, 1985 (A C E F)
- 20/2 A guide to forest seed handling, 1985 (A E)
- 21 Influences exercées par les essences à croissance rapide sur les sols des régions tropicales humides de plaine, 1982 (A E F)
- 22/1 Estimation des volumes et accroissement des peuplements forestiers – Vol. 1. Estimation des volumes, 1980 (A C E F)
- 22/2 Estimation des volumes et accroissement des peuplements forestiers – Vol. 2. Etude et prévision de la production, 1980 (A C E F)
- 23 Prix des produits forestiers 1961-1980, 1981 (A/E/F)
- 24 Cable logging systems, 1981 (A C)

- 25 Public forestry administrations in Latin America, 1981 (A)
- 26 La foresterie et le développement rural, 1981 (A E F)
- 27 Manuel d'inventaire forestier, 1981 (A F)
- 28 Small and medium sawmills in developing countries, 1981 (A E)
- 29 La demande et l'offre mondiales de produits forestiers 1990 et 2000, 1982 (A E F)
- 30 Les ressources forestières tropicales, 1982 (A E F)
- 31 Appropriate technology in forestry, 1982 (A)
- 32 Classification et définitions des produits forestiers, 1982 (A/Ar/E/F)
- 33 Exploitation des forêts de montagne, 1984 (A E F)
- 34 Espèces fruitières forestières, 1982 (A E F)
- 35 Forestry in China, 1982 (A C)
- 36 Technologie fondamentale dans les opérations forestières, 1982 (A E F)
- 37 Conservation et mise en valeur des ressources forestières tropicales, 1983 (A E F)
- 38 Prix des produits forestiers 1962-1981, 1982 (A/E/F)
- 39 Frame saw manual, 1982 (A)
- 40 Circular saw manual, 1983 (A)
- 41 Techniques simples de carbonisation, 1983 (A E F)
- 42 Disponibilités de bois de feu dans les pays en développement, 1983 (A Ar E F)
- 43 Systèmes de revenus forestiers dans les pays en développement, 1987 (A E F)
- 44/1 Essences forestières, fruitières et alimentaires - 1. Exemples d'Afrique orientale, 1984 (A E F)
- 44/2 Essences forestières, fruitières et alimentaires - 2. Exemples de l'Asie du Sud-Est, 1986 (A E F)
- 44/3 Food and fruit-bearing forest species - 3. Examples from Latin America, 1986 (A E)
- 45 Establishing pulp and paper mills, 1983 (A)
- 46 Prix des produits forestiers 1963-1982, 1983 (A/E/F)
- 47 Enseignement technique forestier, 1989 (A E F)
- 48 Evaluation des terres en foresterie, 1988 (A C E F)
- 49 Le débardage de bœufs et de tracteurs agricoles, 1986 (A E F)
- 50 Transformations de la culture itinérante en Afrique, 1984 (A F)
- 50/1 Changes in shifting cultivation in Africa - seven case-studies, 1985 (A)
- 51/1 Etudes sur les volumes et la productivité des peuplements forestiers tropicaux - 1. Formations forestières sèches, 1984 (A F)
- 52/1 Cost estimating in sawmilling industries: guidelines, 1984 (A)
- 52/2 Field manual on cost estimation in sawmilling industries, 1985 (A)
- 53 Aménagement polyvalent intensif des forêts au Kerala, 1985 (A E F)
- 54 Planificación del desarrollo forestal, 1984 (E)
- 55 Aménagement polyvalent intensif des forêts sous les tropiques, 1985 (A E F)
- 56 Breeding poplars for disease resistance, 1985 (A)
- 57 Coconut wood - processing and use, 1985 (A E)
- 58 Sawdoctoring manual, 1985 (A E)
- 59 Les effets écologiques des eucalyptus, 1986 (A C E F)

- 60 Suivi et évaluation des projets de foresterie communautaire, 1989 (A E F)
- 61 Prix des produits forestiers 1965-1984, 1985 (A/E/F)
- 62 Liste mondiale des institutions s'occupant des recherches dans le domaine des forêts et des produits forestiers, 1985 (A/E/F)
- 63 Industrial charcoal making, 1985 (A)
- 64 Boisements en milieu rural, 1987 (A Ar E F)
- 65 La législation forestière dans quelques pays africains, 1986 (A F)
- 66 Forestry extension organization, 1986 (A C E)
- 67 Some medicinal forest plants of Africa and Latin America, 1986 (A)
- 68 Appropriate forest industries, 1986 (A)
- 69 Management of forest industries, 1986 (A)
- 70 Terminologie de la lutte contre les incendies de forêt, 1986 (A/E/F)
- 71 Répertoire mondial des institutions de recherche sur les forêts et les produits forestiers, 1986 (A/E/F)
- 72 Wood gas as engine fuel, 1986 (A E)
- 73 Produits forestiers - Perspectives mondiales: projections 1985-2000, 1986 (A/E/F)
- 74 Guidelines for forestry information processing, 1986 (A)
- 75 An operational guide to the monitoring and evaluation of social forestry in India, 1986 (A)
- 76 Wood preservation manual, 1986 (A)
- 77 Databook on endangered tree and shrub species and provenances, 1986 (A)
- 78 Appropriate wood harvesting in plantation forests, 1987 (A)
- 79 Petites entreprises forestières, 1988 (A E F)
- 80 Forestry extension methods, 1987 (A)
- 81 Guidelines for forest policy formulation, 1987 (A C)
- 82 Prix des produits forestiers 1967-1986, 1988 (A/E/F)
- 83 Trade in forest products: a study of the barriers faced by the developing countries, 1988 (A)
- 84 Produits forestiers - Perspectives mondiales: projections 1987-2000, 1988 (A/E/F)
- 85 Programmes d'enseignement en matière de vulgarisation forestière, 1988 (A/E/F)
- 86 Forestry policies in Europe, 1988 (A)
- 87 Petites opérations de récolte du bois et d'autres produits forestiers par les ruraux, 1989 (A E F)
- 88 Aménagement des forêts tropicales humides en Afrique, 1990 (A F P)
- 89 Review of forest management systems of tropical Asia, 1989 (A)
- 90 Foresterie et sécurité alimentaire, 1993 (A Ar E F)
- 91 Outils et machines simples d'exploitation forestière, 1990 (A E F) (Publié uniquement dans la Collection FAO: Formation, n° 18)
- 92 Forestry policies in Europe - an analysis, 1989 (A)
- 93 Energy conservation in the mechanical forest industries, 1990 (A E)
- 94 Manual on sawmill operational maintenance, 1990 (A)
- 95 Prix des produits forestiers 1969-1988, 1990 (A/E/F)
- 96 Planning and managing forestry research: guidelines for managers, 1990 (A)
- 97 Produits forestiers non ligneux: Quel avenir? 1992 (A E F)
- 98 Les plantations à vocation de bois d'œuvre en Afrique intertropicale

- humide, 1991 (F)
- 99 Cost control in forest harvesting and road construction, 1992 (A)
- 100 Introduction à l'ergonomie forestière dans les pays en développement, 1994 (A E F)
- 101 Aménagement et conservation des forêts denses en Amérique tropicale, 1992 (A F P)
- 102 Gérer et organiser la recherche forestière, 1993 (A E F)
- 103 Mixed and pure forest plantations in the tropics and subtropics, 1992 (E)
- 104 Forest products prices, 1971-1990, 1992 (A)
- 105 Compendium of pulp and paper training and research institutions, 1992 (A)
- 106 Evaluation économique des impacts des projets forestiers, 1994 (A F)
- 107 Conservation des ressources génétiques dans l'aménagement des forêts tropicales – Principes et concepts, 1994 (A F)
- 108 A decade of energy activities within the Nairobi programme of action, 1993 (A)
- 109 FAO/IUFRO directory of forestry research organizations, 1993 (A)
- 110 Actes de la réunion d'experts sur la recherche forestière, 1993 (A/E/F)
- 111 Forestry policies in the Near East region: analysis and synthesis, 1993 (A)
- 112 Evaluation des ressources forestières 1990 – Pays tropicaux, 1994 (A E F)
- 113 Conservation *ex situ* de pollen et de graines, et de cultures *in vitro* de plantes ligneuses pérennes, 1994 (A F)
- 114 Assessing forestry project impacts: issues and strategies, 1993 (A)
- 115 Forestry policies of selected countries in Asia and the Pacific, 1993 (A)
- 116 Les panneaux à base de bois, 1993 (F)
- 117 Mangrove forest management guidelines, 1993 (A)
- 118 Biotechnology in forest tree improvement, 1994 (A)
- 119 Les produits bois reconstitués, liants en environnement, 1994 (F)
- 120 Decline and dieback of trees and forests – A global overview, 1994 (A)
- 121 Ecología y enseñanza rural – Manual para profesores rurales del área andina, 1994 (E)
- 122 Readings in sustainable forest management, 1994 (A)
- 123 Enseignement forestier – Tendances récentes et perspectives, 1994 (A F)

Disponibilité: octobre 1994

| | | | | | |
|----|---|-----------|---------|---|----------------|
| A | - | Anglais | Multil. | - | Multilingue |
| Ar | - | Arabe | * | | Epuisé |
| C | - | Chinois | ** | | En préparation |
| E | - | Espagnol | | | |
| F | - | Français | | | |
| P | - | Portugais | | | |

On peut se procurer les Cahiers techniques de la FAO auprès des points de vente des publications de la FAO, ou en s'adressant directement à la Section distribution et ventes, FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italie.