

## Développement de la cryoconservation pour la conservation des ressources génétiques végétales

Florent Engelmann, Stéphane Dussert

La méthode la plus couramment utilisée pour conserver les ressources génétiques végétales est le stockage des semences. De très nombreuses espèces, y compris la plupart des espèces cultivées ou apparentées aux espèces cultivées, produisent en effet des semences qui peuvent être déshydratées jusqu'à des teneurs en eau réduites et stockées à basse température. Leur longévité augmente dans ces conditions de conservation. Les semences ayant de telles propriétés sont appelées orthodoxes [1].

Cependant, plusieurs catégories de plantes présentent des problèmes pour la conservation de leurs semences. Tout d'abord, un nombre important d'espèces, principalement tropicales ou sub-tropicales, telles que le cocotier, le cacaoyer, ainsi que de nombreux ligneux tropicaux ont des semences qui ne subissent pas de déshydratation au cours de leur maturation et sont disséminées avec une teneur en eau relativement élevée [2]. Ces semences ne supportent pas une déshydratation, même limitée, et sont souvent sensibles au froid. Appelées récalcitrantes [1], elles doivent être conservées dans des

conditions de température et d'humidité relativement élevées et, même lorsqu'elles sont stockées dans les conditions optimales, leur longévité est limitée à quelques semaines ou quelques mois. Les semences d'une troisième catégorie de plantes sont dites intermédiaires [3]. Ces semences peuvent être déshydratées jusqu'à des teneurs en eau relativement réduites, mais elles sont sensibles aux basses températures. Par comparaison avec des semences récalcitrantes, leur durée de stockage peut être prolongée, mais il est impossible d'obtenir une conservation à long terme, comme avec les semences orthodoxes. Cette catégorie de semences inclut des plantes d'intérêt économique telles que le caféier et le palmier à huile [3, 4].

Certaines plantes telles que les bananiers fruits et les plantains ne produisent pas de semences. D'autres plantes, telles que de nombreux fruitiers, la pomme de terre, l'igname, le manioc, la patate douce ou la canne à sucre ont à la fois des génotypes stériles et d'autres qui produisent des semences orthodoxes. Cependant, ces semences correspondent généralement à des génotypes fortement hétérozygotes et sont donc d'un intérêt limité pour la conservation de génotypes particuliers. Toutes ces espèces sont ainsi propagées végétativement.

À l'heure actuelle, la méthode classiquement utilisée pour conserver les ressources génétiques de ces espèces est la conservation en champ de plantes entières. Ce mode de conservation pose cependant des problèmes importants [5]. Les collections restent exposées aux aléas

climatiques, aux attaques des pathogènes et ravageurs et, de plus, les coûts en main-d'œuvre sont très élevés. Enfin, la distribution et l'échange de matériel à partir des collections en champ sont difficiles, du fait de la nature végétative du matériel et des risques inhérents de transfert de maladies.

Jusqu'à présent, la plupart des activités de conservation des ressources génétiques se sont concentrées sur les plantes cultivées et les espèces apparentées. Cependant, la conservation des espèces rares et menacées est aujourd'hui devenue d'actualité.

Enfin, le développement des biotechnologies a conduit à la production d'une nouvelle catégorie de ressources génétiques, qui inclut des clones obtenus à partir de génotypes élites, des lignées cellulaires ayant des caractéristiques particulières et du matériel transgénique [6]. Ces nouvelles ressources ont souvent une très haute valeur ajoutée et sont difficiles et onéreuses à produire. Le développement de techniques performantes permettant d'assurer leur conservation en toute sécurité est donc d'une grande importance.

La cryoconservation, c'est-à-dire le stockage de matériel biologique à une température ultra-basse, généralement celle de l'azote liquide ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), est la seule technique disponible à l'heure actuelle qui permette d'assurer la conservation à long terme, en toute sécurité et à coût réduit, de ces différentes ressources génétiques.

Dans cet article, nous présentons les différentes techniques de cryoconservation

F. Engelmann : International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Via delle Sette Chiese 142, 00145 Rome, Italie.

<f.engelmann@cgiar.org>

S. Dussert : Institut de recherche pour le développement (IRD), BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France.

<dussert@mpl.ird.fr>

Tirés à part : F. Engelmann

disponibles pour les tissus et organes végétaux, ainsi que leur application actuelle, et nous discutons le futur de l'utilisation de la cryoconservation dans le cadre de la conservation des ressources génétiques végétales.

## Principes de la cryoconservation

Certains organes végétaux, tels que les semences orthodoxes et les bourgeons dormants résistants au froid, contiennent des quantités d'eau très faibles et peuvent ainsi être congelés directement, sans traitement préalable. Cependant, la plupart des systèmes employés en cryoconservation (suspensions cellulaires, cals, apex, embryons) sont cultivés *in vitro* et contiennent des quantités d'eau très élevées. C'est également le cas des semences non orthodoxes et de leurs embryons zygotiques. Pour tous ces types de matériel qui ne sont pas intrinsèquement tolérants à la congélation, les cellules doivent être déshydratées artificiellement pour les protéger des dommages causés par la cristallisation de l'eau intracellulaire [7]. On peut distinguer deux types de techniques en fonction des mécanismes physiques sur lesquels elles reposent : les techniques classiques et les nouvelles techniques de cryoconservation [8]. Les techniques classiques comprennent une déshydratation induite par la congélation visant à réduire le nombre et la taille des cristaux de glace intracellulaire, alors que les nouvelles techniques sont fondées sur la vitrification, qui peut être définie comme la transition de l'eau directement de la phase liquide en une phase vitreuse amorphe, évitant ainsi la formation de glace cristalline dans les cellules [9].

Les techniques classiques de cryoconservation comprennent un refroidissement lent jusqu'à une température de pré-refroidissement définie, suivi par une immersion directe dans l'azote liquide. Avec l'abaissement de la température au cours du refroidissement lent, les cellules et le milieu externe sont d'abord en surfusion, puis le milieu externe prend en glace le premier [7]. La membrane cellulaire agit alors comme une barrière physique et empêche la cristallisation du milieu interne ; les cellules restent ainsi en surfusion. Leur pression de vapeur aqueuse est plus élevée que celle du compartiment externe, ce qui induit un

flux d'eau intracellulaire vers le compartiment extracellulaire et ainsi la concentration des solutés intracellulaires. L'eau intracellulaire qui sort des cellules est immédiatement convertie en glace dans le compartiment extracellulaire, ce qui accélère le phénomène. En conditions optimales, la majeure partie ou la totalité de l'eau intracellulaire cristallisable est extraite des cellules, ce qui réduit ou supprime la formation dommageable de glace intracellulaire lors de l'immersion des échantillons dans l'azote liquide. Cependant, une déshydratation trop intense peut induire différents dommages liés à l'augmentation de la concentration des sels intracellulaires et à des changements dans la conformation de la membrane cellulaire [7]. Le réchauffement doit être aussi rapide que possible pour éviter le phénomène de recristallisation, au cours duquel les cristaux de glace formés pendant le refroidissement fusionnent pour donner des cristaux de taille plus importante, thermodynamiquement plus favorable, mais également plus dommageable pour l'intégrité cellulaire [7].

Dans les nouvelles techniques de cryoconservation, fondées sur la vitrification, la déshydratation cellulaire est réalisée avant la congélation en exposant les échantillons à des solutions cryoprotectrices extrêmement concentrées et/ou en les soumettant à une dessiccation physique, ce qui a pour effet d'extraire l'eau cristallisable des cellules. Les échantillons sont ensuite refroidis rapidement. La formation de glace intracellulaire est ainsi évitée. Des transitions vitreuses (changements dans la conformation structurale du verre) ont été enregistrées au cours de la congélation de différents matériels végétaux en utilisant la technique de microcalorimétrie différentielle à balayage [10-13].

## Protocoles de cryoconservation

Pour chaque nouveau matériel à cryoconservé, les conditions de chacune des étapes successives du protocole doivent être optimisées. Un protocole de cryoconservation comprend les étapes suivantes : sélection du matériel végétal, préculture, traitement cryoprotecteur, congélation, réchauffement et post-traitement.

## Protocoles classiques

Au cours d'un protocole classique de cryoconservation, les échantillons subissent d'abord une préculture de quelques heures ou jours en présence d'osmotiques tels que le mannitol ou le sorbitol pour provoquer une légère déshydratation [14]. Ils sont ensuite soumis à un traitement cryoprotecteur avec des substances variées (sucres, polyols, diméthylsulfoxyde, etc.). La congélation est réalisée en deux étapes : un refroidissement lent jusqu'à une température donnée, dite de pré-refroidissement, suivi d'une immersion rapide des échantillons dans l'azote liquide. Les vitesses de refroidissement généralement employées varient entre 0,5 et quelques °C/min jusqu'à des températures de pré-refroidissement aux alentours de -40 °C [14]. Les techniques classiques nécessitent l'utilisation de congélateurs programmables sophistiqués et coûteux. Dans certains cas, leur emploi peut être évité en utilisant un congélateur ménager ou de laboratoire pour réaliser le pré-refroidissement [15]. Après le réchauffement, les agents cryoprotecteurs sont éliminés en transférant les échantillons sur des milieux neufs à intervalles rapprochés. Pour stimuler la reprise de croissance, les conditions standard de culture sont parfois transitoirement modifiées, par exemple en diminuant l'intensité lumineuse ou en changeant la composition hormonale ou minérale du milieu de culture [14, 15]. Les techniques classiques de cryoconservation sont depuis longtemps utilisées avec succès pour la congélation de suspensions cellulaires et de cals, qui sont composés de petites unités relativement uniformes au niveau histologique [16, 17]. Elles sont également applicables pour la congélation d'apex de certaines espèces tolérantes au froid, mais non pour celle d'espèces tropicales ou sub-tropicales [18].

## Nouvelles techniques

Les nouvelles techniques de cryoconservation présentent des avantages par rapport aux techniques classiques. En évitant la formation de glace cristalline dans les échantillons, elles sont plus appropriées pour la congélation d'organes complexes tels que les apex et les embryons, composés de types cellulaires différents qui nécessiteraient chacun des conditions particulières de déshydratation induite par la congélation. Elles ne requièrent pas l'utili-

sation de congélateurs programmables et ont une large applicabilité, ne nécessitant que des modifications mineures pour leur adaptation à des matériels et types cellulaires différents [15].

Une caractéristique commune des nouveaux protocoles est que l'étape critique pour obtenir la survie est la déshydratation et non la congélation, comme dans les protocoles classiques. Ainsi, si les échantillons à congeler peuvent être rendus tolérants à une dessiccation jusqu'à des teneurs en eau suffisamment basses, sans diminution ou avec une diminution limitée de la survie par rapport aux témoins non déshydratés, des pourcentages de survie similaires sont généralement observés [15].

On distingue sept procédures différentes : l'encapsulation-déshydratation, la vitrification, l'encapsulation-vitrification, la dessiccation, la préculture, la préculture-dessiccation, et la congélation en gouttes.

- L'encapsulation-déshydratation est fondée sur la technologie développée pour la production des semences artificielles. Les explants sont encapsulés dans des billes d'alginate de calcium, pré-cultivés en milieu liquide enrichi en sucre pendant 1 à 7-10 jours, partiellement déshydratés sous la hotte à flux laminaire ou avec du silicagel jusqu'à une teneur en eau d'environ 20 % par rapport à la masse de matière sèche, puis refroidis rapidement. Les pourcentages de survie sont généralement élevés et la reprise de croissance est rapide et directe, sans formation de cal. Cette technique, mise au point sur le poirier [19], a été appliquée avec succès aux apex de nombreuses espèces tempérées et tropicales [8, 15], ainsi qu'à des suspensions cellulaires et des embryons somatiques [20, 21].

- La vitrification comprend un traitement des échantillons de courte durée avec des cryoprotecteurs à concentration intermédiaire (appelé *loading treatment*), une déshydratation avec des solutions de vitrification extrêmement concentrées en cryoprotecteurs, suivie d'un refroidissement ultra-rapide. Cette technique a été appliquée aux apex, suspensions cellulaires et embryons somatiques de nombreuses espèces [22, 23].

- L'encapsulation-vitrification est une combinaison des deux techniques précédentes, dans laquelle les échantillons sont encapsulés dans des billes d'alginate puis déshydratés en utilisant des solutions de vitrification. Cette technique a été appliquée aux apex d'un nombre encore limité d'espèces [23].

- La dessiccation est la procédure la plus simple puisqu'elle consiste à déshydrater

les explants, puis à les congeler rapidement par immersion directe dans l'azote liquide. Cette technique est principalement utilisée pour les embryons zygotiques et axes embryonnaires d'espèces à semences récalcitrantes [24, 25]. La dessiccation est généralement effectuée sous la hotte à flux laminaire, mais des conditions de déshydratation plus précises et reproductibles sont obtenues en utilisant un flux d'air comprimé stérile ou du silicagel. Une déshydratation ultra-rapide dans un flux d'air comprimé sec (procédé appelé *flash-drying*, développé par le groupe du Pr Berjak en Afrique du Sud) permet de congeler des explants avec une teneur en eau relativement élevée, ce qui réduit ainsi les dommages liés à la dessiccation [26, 27]. La survie est généralement optimale pour des teneurs en eau de l'ordre de 10-20 % (MF).

- La technique de pré-culture consiste à cultiver les échantillons en présence de cryoprotecteurs, puis à les congeler par immersion directe dans l'azote liquide. Cette procédure a été développée pour cryoconserver des massifs méristématiques de bananier [28].

- Dans un protocole de pré-culture-déshydratation, les explants sont pré-cultivés en présence de cryoprotecteurs, en général des sucres, déshydratés sous la hotte à flux laminaire ou avec du silicagel et congelés rapidement. Cette méthode a été appliquée à des segments de tige d'asperges, des embryons somatiques de palmier à huile et des embryons zygotiques de cocotier [29-31].

- Enfin, la technique de congélation en gouttes a été développée pour les apex de pomme de terre [32]. Les apex sont pré-traités dans un milieu cryoprotecteur liquide, puis placés sur des bandes de papier aluminium dans des microgouttes de cryoprotecteur et congelés par immersion directe dans l'azote liquide.

## Développement actuel des techniques de cryoconservation

La résistance à la congélation dans l'azote liquide a déjà été prouvée pour de très nombreux matériels, naturellement résistants ou non à la déshydratation. Les semences orthodoxes de plus de 300 espèces ont été cryoconservées [33, 34], de même que les bourgeons dor-

mants d'une dizaine d'espèces ligneuses [35] et le pollen de plusieurs dizaines d'espèces [36]. En ce qui concerne le matériel *in vitro*, des protocoles de cryoconservation sont disponibles pour les cultures indifférenciées (suspensions cellulaires, cal) de très nombreuses espèces [14, 17, 37]. Pour les explants différenciés tels qu'apex, embryons somatiques et zygotiques, de nombreux protocoles ont également été publiés [15, 37] mais la cryoconservation connaît des degrés de développement différents pour les espèces multipliées végétativement et celles à semences récalcitrantes [24, 38].

## Espèces multipliées végétativement

Pour les espèces multipliées végétativement, la cryoconservation a une applicabilité très large tant en termes d'espèces couvertes – puisque des protocoles ont été publiés pour les méristèmes d'espèces d'origine tropicale et tempérée incluant des racines et tubercules, des fruitiers, des plantes ornementales et industrielles – qu'en termes du nombre de génotypes/variétés répondant positivement au sein d'une même espèce. Les techniques fondées sur la vitrification sont préférentiellement employées, bien que les techniques classiques puissent également être utilisées pour les espèces tempérées. Il est intéressant de noter que, dans de nombreux cas, différentes techniques donnent des résultats comparables avec le même matériel (*tableau 1*). La reprise après cryoconservation est généralement élevée et la régénération est rapide et directe (sans callogenèse transitoire). Différentes raisons peuvent être invoquées pour expliquer ces résultats. La zone méristématique des apex, à partir de laquelle s'effectue la croissance organisée, est composée d'une population relativement homogène de petites cellules en division, présentant des vacuoles de petite taille et un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, caractéristiques, qui les rendent plus aptes à supporter la dessiccation que des cellules fortement vacuolisées et différenciées. De plus, les études histo-cytologiques réalisées révèlent que la structure des apex est généralement préservée dans sa quasi-totalité lorsque les techniques fondées sur la vitrification sont employées [49]. Ces bons résultats doivent être également

**Tableau 1**

**Exemples d'essais de cryoconservation réalisés avec les apex de quelques plantes à multiplication végétative**

Espèce	Technique de congélation	Nbre d'accessions congelées	Survie (%)	Type de régénération	Référence
<i>Dioscorea</i> spp.	E	4	54 (26-71)	D (2 espèces) I (2 espèces)	[39]
<i>D. bulbifera</i> et <i>D. alata</i>	E	2	Jusqu'à 100	D	[40]
<i>Musa</i> spp.	E	1	8	D	[28]
	P	15	30 (7-67)	D	[41]
	V	2	60-70	D	[42]
<i>Pyrus</i> spp.	V	8	60 (40-73)	D	[15]
	E	3	69 (67-70)	D	[43]
	E	11	50 (23-80)	D	[44]
	CP	1	60	D	[44]
<i>Solanum</i> spp.	CP	19	48 (0-100)	I + D	[45]
	V	5	56 (37-94)	D	[46]
	E	6	40 (9-59)	D	[47]
	G	219	40 (4-100)	D	[48]

Techniques de congélation employées : V : vitrification ; E : encapsulation-déshydratation ; CP : congélation programmée ; P : préculture ; G : congélation en gouttes. Les résultats de survie indiquent le pourcentage moyen de survie obtenu et entre parenthèses les valeurs minimales et maximales. D : reprise directe de la croissance ; I : reprise indirecte de la croissance.

**Cryopreservation tests carried out with apices of a few vegetatively propagated plants**

associés à la maîtrise des protocoles de culture *in vitro* pour les espèces concernées. En effet, la plupart des espèces à multiplication végétative qui ont été cryoconservées avec succès sont des espèces cultivées pour lesquelles la micropropagation *in vitro* a été bien établie, souvent à des fins commerciales. De plus, le matériel est synchronisé par la culture *in vitro* et le prétraitement. Ainsi, des explants relativement homogènes en termes de taille, composition cellulaire, état physiologique et vitesse de croissance sont disponibles pour la congélation, ce qui augmente les chances de réponse positive et uniforme aux traitements [38]. Enfin, les procédures fondées sur la vitrification permettent d'utiliser des échantillons de taille relativement importante (apex de 0,5 à 2-3 mm) qui peuvent reprendre leur croissance directement et sans difficultés.

**Espèces à semences récalcitrantes**

De nombreux articles ont été publiés ces dernières années sur la cryoconservation

des embryons ou des axes embryonnaires d'espèces à semences non orthodoxes [10, 11, 24, 25, 37]. Ceci pourrait mener à la conclusion que la congélation d'embryons est une procédure applicable en routine à de nombreuses espèces, quelles que soient les caractéristiques de conservation de leurs semences. Cependant, un examen approfondi de ces listes révèle que seul un nombre restreint d'espèces à semences vraiment récalcitrantes est présent. Ceci est dû en partie au fait que très peu d'équipes de recherche travaillent dans ce domaine. Une autre raison est que la récalcitrance est un concept dynamique [40], qui évolue avec la recherche effectuée sur la biologie des semences et l'amélioration des procédures de stockage classiques. Ainsi, les semences de caféier et de palmier à huile ont longtemps été classées comme récalcitrantes, mais des travaux récents [3, 4] ont montré qu'elles ont en réalité un comportement intermédiaire. En comparaison avec les plantes à multiplication végétative, il est ainsi clair que la recherche est beaucoup moins avancée pour les espèces à semences récalcitrantes. La technique de dessiccation est principalement employée pour congeler les

embryons ou axes embryonnaires (tableau 2). Les pourcentages de survie obtenus sont extrêmement variables mais généralement faibles. De plus, la régénération après cryoconservation est souvent limitée à une callogenèse ou à un développement incomplet des plantules. Il y a un nombre restreint de cas pour lesquels des plantes entières ont été régénérées, comme avec le cocotier et des palmiers ornementaux [30, 59].

Différentes raisons expliquent cette situation. Tout d'abord, les connaissances sur la biologie des espèces récalcitrantes, et *a fortiori* la biologie de leurs semences, sont souvent limitées, voire nulles, notamment parce que nombre d'entre elles sont des espèces sauvages. Dans les cas où des informations sont disponibles sur la biologie des semences, les protocoles de culture *in vitro*, indispensables pour l'étape de reprise de croissance après la congélation des embryons zygotiques, sont souvent inexistantes ou non opérationnels [60, 61]. Les semences récalcitrantes et leurs embryons ont de plus des caractéristiques qui rendent leur cryoconservation difficile. La première d'entre elles est qu'il n'y a pas d'arrêt dans leur développement, comme chez les semences orthodoxes [26]. Il est donc très difficile de sélectionner les semences à un stade précis de leur développement, alors que c'est un paramètre d'importance critique pour leur cryoconservation. Des variations très importantes pour la teneur en eau des semences à « maturité » sont observées à l'intérieur d'un même lot, entre lots de provenances ou d'années de récolte différentes [62], ce qui pourrait expliquer le manque de reproductibilité souvent observé dans les essais. Par ailleurs, les embryons ou axes embryonnaires ont une structure histologique souvent complexe, contenant plusieurs types de tissus qui ont des sensibilités différentes à la dessiccation et à la congélation : par exemple, le pôle racinaire est souvent plus résistant que le pôle caulinaire [51, 56, 63]. Enfin, les embryons de certaines espèces sont de dimensions trop importantes pour envisager leur utilisation pour la cryoconservation et, chez d'autres espèces, il est très difficile de localiser l'embryon dans la semence [62].

Différentes solutions existent pour améliorer cette situation. Tout d'abord, pour la cryoconservation des embryons ou des axes embryonnaires, d'autres techniques de cryoconservation que la dessiccation doivent être expérimentées. Il est égale-

**Tableau 2**

**Exemples d'essais de cryoconservation réalisés avec les embryons zygotiques ou axes embryonnaires de quelques plantes à semences récalcitrantes (selon Hong *et al.* [58])**

Espèce	Technique de congélation	Teneur en eau optimale (% PF)	Survie (%)	Type de régénération	Référence
<i>Araucaria excelsa</i>	Ds	13	30	Callogenèse pôle racinaire	[51]
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	CP	29-33	60	Plantes ?	[52]
	Ds	13,7	30	Croissance racine et tige	[53]
<i>Calamus manan</i>	Ds	7,3	27	Plantules <i>in vitro</i>	[54]
<i>Cocos nucifera</i>	PD	-	33-93	Plantes entières en champ	[30]
<i>Hevea brasiliensis</i>	Ds	14-20	20-69	Plantules <i>in vitro</i>	[55]
<i>Quercus falcata</i>	Ds	25	60	Grossissement + callogenèse	[56]
<i>Q. macrocarpa</i>	Ds	36	?	Callogenèse	
<i>Q. nigra</i>	Ds	25	40	Élongation hypocotyle + callogenèse	
<i>Q. palustris</i>	Ds	25	10	Callogenèse	
<i>Q. rubra</i>	Ds	20	80	Élongation racine + verdissement et gonflement du pôle caulinaire	
<i>Theobroma cacao</i>	CP	-	50	Callogenèse + embryons adventifs	[57]

Techniques de congélation employées : Ds : dessiccation ; CP : congélation programmée ; PD : préculture déshydratation. Les résultats de survie indiquent le pourcentage moyen ou les valeurs minimales et maximales de survie obtenus.

**Cryopreservation tests carried out with zygotic embryos or apical buds of a few recalcitrant seed species**

ment nécessaire de mettre au point, pour toute nouvelle espèce, des conditions de culture *in vitro* suffisamment performantes avant de commencer les essais de cryoconservation [24, 38]. Enfin, avec les espèces pour lesquelles il s'avère impossible de congeler les embryons zygotiques ou les axes embryonnaires, certains auteurs ont suggéré d'utiliser les apex prélevés sur les embryons zygotiques ou les plantules *in vitro*, ou bien des bourgeons adventifs ou embryons somatiques induits à partir des tissus embryonnaires [62, 63].

**Utilisation de la cryoconservation à grande échelle**

Bien que son emploi en routine soit encore limité, il existe un nombre croissant d'exemples d'utilisation de la cryoconservation à grande échelle pour différents types de matériels, naturellement résistants ou non à la déshydratation.

Dans le cas des espèces orthodoxes, la cryoconservation est principalement utilisée pour le stockage des semences à longévité restreinte et d'espèces rares ou menacées [64-66]. Ainsi, le *National Seed Storage Laboratory* (NSSL, Fort Collins, Colorado, États-Unis) conserve 37 654 accessions (sur un total de 360 629) dans les vapeurs d'azote liquide [67]. Le *National Bureau for Plant Genetic Resources* (NBPGR, New Delhi, Inde) stocke 1 200 accessions de 50 espèces, principalement de plantes médicinales menacées [68]. Cette technique est également utilisée dans certains jardins botaniques : ainsi, 113 accessions d'espèces rares ou menacées sont cryoconservées au jardin botanique de Perth, Australie [69], et le jardin botanique de Cincinnati (États-Unis) conserve dans l'azote les semences d'espèces rares et menacées de l'État de l'Ohio [70].

La cryoconservation est également appliquée à des semences intermédiaires résistantes à la congélation. Ainsi, au CATIE (Costa Rica), les semences de 80 accessions de *Coffea arabica*, représentant une collection de référence (*core collection*) de la collection au champ de caféiers, sont

en cours de stockage dans l'azote liquide [71] en utilisant la technique mise au point par Dussert *et al.* [72].

Dans le cas des bourgeons dormants, 1 700 des 2 200 accessions de la collection américaine de pommiers ont déjà été cryoconservées [73], ainsi que les 420 accessions de la collection de mûriers conservée en champ au *National Institute of Agrobiological Resources* (NIAR, Yamagata, Japon) [74].

Certaines entreprises conservent du pollen dans l'azote liquide, dans le cadre de leurs programmes d'amélioration [75]. Le pollen, également reconnu comme un matériel intéressant pour la conservation des ressources génétiques, est stocké dans ce contexte par quelques instituts : ainsi, le NBPGR conserve du pollen congelé de 65 accessions appartenant à diverses espèces [68], et l'*Indian Institute for Horticultural Research* (IIHR, Bangalore, Inde) celui de 600 accessions appartenant à 40 espèces de 15 familles différentes, dont certaines ont été conservées pendant plus de 15 ans [76].

La cryoconservation est également appliquée à des produits des biotechnologies. Plus de 1 000 lignées de cals d'espèces d'intérêt pharmaceutique sont ainsi conservées à -196 °C [77], de même que plusieurs milliers de lignées de suspensions embryogènes de conifères, utilisées dans des programmes de plantations clonales à grande échelle [78], ainsi que les embryons somatiques de plusieurs dizaines de génotypes de caféiers et de palmier à huile [79, 80].

Enfin, la cryoconservation est en cours d'application dans des banques de gènes pour la conservation à long terme des ressources génétiques d'espèces multipliées végétativement, en utilisant les apex de plantes *in vitro*. Son développement est le plus avancé chez la pomme de terre, puisque 219 variétés anciennes de la collection du FAL (Braunschweig, Allemagne) [32, 48] ainsi que près de 200 variétés du *Centro Internacional de la Papa* (CIP, Lima, Pérou) [81] sont aujourd'hui cryoconservées. Une centaine d'accessions de *Pyrus* sont également conservées dans l'azote au *National Clonal Germplasm Repository* (NCGR, Corvallis, États-Unis) [82]. Enfin, des collections cryoconservées sont actuellement en cours de mise en place pour des espèces tropicales telles que le bananier et le manioc [41, 83].

Les études réalisées sur le coût de la cryoconservation sont encore fragmentaires, mais les premières évaluations semblent confirmer l'intérêt de cette

## Summary

### Current development of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources

F. Engelmann, S. Dussert

*Cryopreservation (storage at the temperature of liquid nitrogen, -196° C) is the only currently available technique that ensures the safe long-term conservation of the genetic resources of species with recalcitrant seeds, of vegetatively propagated species, of endangered species and of biotechnology products such as cell strains with special attributes, elite clones and transformed material. New cryopreservation techniques and the physical mechanisms upon which they are based differ from classical techniques. Classical techniques involve freeze-induced dehydration, whereas new techniques are based on vitrification. Vitrification can be defined as the transition of water directly from the liquid phase into an amorphous phase or glass, whilst avoiding crystalline ice formation. Classical cryopreservation techniques involve slow cooling down to a specific prefreezing temperature, followed by rapid immersion in liquid nitrogen. In new vitrification-based procedures, cell dehydration is performed prior to freezing by exposure of samples to concentrated cryoprotective media and/or air desiccation. This is followed by rapid cooling. There are seven key vitrification-based procedures: (1) encapsulation-dehydration; (2) vitrification; (3) encapsulation-vitrification; (4) desiccation; (5) pregrowth; (6) pregrowth-desiccation; and (7) droplet freezing.*

*Resistance to freezing in liquid nitrogen has been demonstrated for orthodox and intermediate seeds, cold-tolerant dormant buds, pollen and in vitro cultures, including cell suspensions, calluses, apices, somatic and zygotic embryos. Cryopreservation is well advanced for vegetatively propagated species and many techniques are ready for large scale experimentation. Research is much less advanced for recalcitrant seed species due to some of their characteristics, including their very high sensitivity to desiccation, their structural complexity and their heterogeneity in terms of developmental stage and water content at maturity. There are, nevertheless, various technical approaches to be explored in order to develop cryopreservation techniques for a larger number of recalcitrant seed species.*

*Although the routine use of cryopreservation is still limited, cryopreservation is used on a large scale to an increasing extent. Cryopreservation is implemented in some genetic resource centers for the conservation of orthodox seeds with limited longevity and of rare and endangered species, of dormant buds of temperate fruit trees and of pollen from horticultural species. It is also applied in biotechnology programmes for the conservation of cell strains belonging to species of pharmaceutical interest and of embryogenic suspensions of elite genotypes of conifers. Finally, cryopreservation is currently being applied for long-term conservation of genetic resources of several vegetatively propagated crops such as potato, banana and cassava.*

*In conclusion, there have been major advances in cryopreservation in recent years, with the development of new vitrification-based freezing techniques which are operationally simple, efficient and have a broad applicability. Moreover, research carried out by various teams worldwide is progressively improving our understanding of mechanisms involved in cryopreservation, which should allow less empirical development of cryopreservation. It can thus be expected that the utilization of cryopreservation in genetic resources conservation and biotechnology programmes will increase steadily in the coming years.*

Cahiers Agricultures 2000 ; 9 : 237-45.

technique quant au faible coût de son utilisation. Hummer et Reed [84] indiquent que le coût annuel du maintien d'une accession de fruitiers tempérés est de 77 US \$ en champ, 23 US \$ en croissance ralentie *in vitro*, et seulement de 1 US \$ en cryoconservation, à quoi il

faut ajouter 50 à 65 US \$ pour introduire cette accession en cryoconservation. Roca [comm. pers.] évalue le coût annuel du maintien de la collection de manioc du CIAT à environ 5 000 US \$ pour le stockage dans l'azote liquide, contre 6 fois plus en croissance ralentie *in vitro*.

## Conclusion et perspectives

Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années dans le domaine de la cryoconservation des ressources génétiques végétales, grâce au développement des techniques fondées sur la vitrification, qui sont d'une mise en œuvre simple et ont une large applicabilité.

Pour la plupart des espèces multipliées végétativement, les techniques de cryoconservation sont suffisamment avancées pour envisager leur utilisation immédiate pour des essais à grande échelle dans les banques de gènes. La recherche est nettement moins avancée pour les espèces à semences récalcitrantes. Ceci est dû principalement au manque de connaissances sur la biologie de ces espèces, en général, et de leurs semences, en particulier, qui doit être relié dans la plupart des cas à leur origine tropicale, leur caractère sauvage et à leur très grande diversité, ainsi qu'au nombre comparativement très faible d'équipes de recherche travaillant sur la cryoconservation de telles espèces. Plusieurs approches techniques ont cependant été identifiées, qui devraient permettre d'améliorer la conservation à long terme de ces espèces. De plus, différentes équipes de recherche dans le monde étudient les mécanismes physiques et biochimiques impliqués dans la sensibilité à la dessiccation et aux basses températures. Ceci devrait permettre à la fois d'améliorer notre compréhension de la récalcitrance des semences et de mettre au point des protocoles de cryoconservation de manière moins empirique que cela n'a été fait jusqu'à présent.

Même si les situations dans lesquelles la cryoconservation est utilisée en routine sont encore rares, leur nombre a considérablement augmenté au cours des dernières années, tant dans le cadre de programmes de conservation des ressources génétiques que dans celui de programmes de biotechnologie, et cette tendance devrait s'accroître dans les années à venir. Enfin, il est important de souligner que la cryoconservation n'est pas destinée à remplacer les techniques conventionnelles de conservation *ex situ* mais qu'elle représente un outil supplémentaire à la disposition des gestionnaires de banques de gènes pour améliorer la conservation des ressources génétiques placées sous leur responsabilité ■

## Références

1. Roberts HF. Predicting the viability of seeds. *Seed Sci Technol* 1973 ; 1 : 499-514.
2. Chin HF, Pritchard H. *Recalcitrant seeds, a status report*. Rome : International Board for Plant Genetic Resources, 1988 ; 28 p.
3. Ellis RE, Hong T, Roberts EH. An intermediate category of seed storage behaviour ? I. coffee. *J Exp Bot* 1990 ; 41 : 1167-74.
4. Ellis RE, Hong T, Roberts EH, et al. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Sci Res* 1991 ; 1 : 99-104.
5. Withers LA, Engels JMM. The test tube genebank – a safe alternative to field conservation. *IBPGR Newsl for Asia and the Pacific* 1990 ; 3 : 1-2.
6. Engelmann F. Cryopreservation for the long-term conservation of tropical crops of commercial importance. In : Shamaan NA, Mahmood M, Muse R, et al., eds. *Applications of plant in vitro technology*. Serdang : University Pertanian Malaysia, 1994 : 64-77.
7. Mazur P. Freezing of living cells : mechanisms and applications. *Am J Physiol* 1984 ; 247.
8. Withers LA, Engelmann F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In : Altman A, ed. *Biotechnology in agriculture*. New York : Marcel Dekker Inc., 1998 : 57-88.
9. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984 ; 21 : 407-26.
10. Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 1990 ; 9 : 30-3.
11. Dereuddre J, Hassen M, Blandin S, et al. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen : 2. Thermal analysis. *Cryo-Letters* 1991 ; 12 : 135-48.
12. Tannoury M, Ralambosoa J, Kaminski M, et al. Cryopreservation by vitrification of coated shoot-tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultured *in vitro*. *C R Acad Sc Paris* 1991, Sér III ; 31 : 633-8.
13. Niino T, Sakai A, Yakuwa H, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell Tissue Org Cult* 1992 ; 28 : 261-6.
14. Kartha KK, Engelmann F. Cryopreservation and germplasm storage. In : Vasil IK, Thorpe TA, eds. *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht : Kluwer, 1994 : 195-230.
15. Engelmann F. *In vitro* conservation methods. In : Ford-Lloyd BV, Newbury JH, Callow JA, eds. *Biotechnology and plant genetic resources : conservation and use*. Wellingford : CABI, 1997 : 119-62.
16. Seitz U. Cryopreservation of plant cell cultures. *Planta Medica* 1987 ; 4 : 311-4.
17. Withers LA. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In : Kartha KK, ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton : CRC Press, 1985 : 243-67.
18. Reed BM, Chang Y. Medium- and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops. In : Razdan MK, Cocking EC, eds. *Conservation of plant genetic resources in vitro*. Vol. 1 : General aspects. Enfield : Science Publishers Inc, 1997 : 67-105.
19. Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y, Duron M. Résistance d'apex caulinaires de vitroplants de poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy), enrobés dans l'alginate, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide : effet d'un endurcissement préalable au froid. *C R Acad Sci Paris* 1990, Sér III ; 310 : 317-23.
20. Bachiri Y, Gazeau C, Hansz J, et al. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue Org Cult* 1995 ; 43 : 241-8.
21. Tessereau H, Florin B, Meschine MC, Thierry C, Pétiard V. Cryopreservation of somatic embryos : a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. *Ann Bot* 1994 ; 74 : 547-55.
22. Sakai A. Cryopreservation for germplasm collection in woody plants. In : Jain S, Gupta P, Newton R, eds. *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 1. Dordrecht : Kluwer, 1995 : 293-315.
23. Sakai A. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. In : Razdan MK, Cocking EC, eds. *Conservation of plant genetic resources in vitro*. Vol. 1 : General aspects. Enfield : Science Publishers Inc, 1997 : 53-66.
24. Engelmann F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genet Res Newsl* 1997 ; 112 : 9-18.
25. Engelmann F, Dumet D, Chabrilange N, et al. Cryopreservation of zygotic and somatic embryos from recalcitrant and intermediate-seed species. *Plant Genet Res Newsl* 1995 ; 103 : 27-31.
26. Berjak P, Farrant JM, Mycock DJ, et al. Homiohydrous (recalcitrant) seeds : the enigma of their desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. *Planta* 1989 ; 186 : 249-61.
27. Wesley-Smith J, Vertucci CW, Berjak P, et al. Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. *J Plant Physiol* 1992 ; 140 : 596-604.
28. Panis B. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. *Dissertationes de Agricultura*, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, 1995 ; 205 p.
29. Uragami A, Sakai A, Magai M. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Rep* 1990 ; 9 : 328-31.
30. Assy-Bah B, Engelmann F. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo-Letters* 1992 ; 13 : 117-26.
31. Dumet D, Engelmann F, Chabrilange N, et al. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-Letters* 1993 ; 14 : 243-50.
32. Schäfer-Menuhr A, Mix-Wagner G, Schumacher HM. Cryopreservation of potato cultivars – design of a method for routine application in genebanks. *Acta Hort* 1997 ; 447 : 477-82.
33. Stanwood PC, Bass LN. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci Technol* 1981 ; 9 : 423-7.
34. Stanwood PC. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In : Kartha KK, ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton : CRC Press, 1985 : 199-226.
35. Sakai A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry* Vol. 32. *Cryopreservation of plant germplasm I*. Berlin : Springer Verlag, 1995 : 53-69.
36. Hanna WW, Towill LE. Long-term pollen storage. In : Janick J, ed. *Plant breeding reviews*. Vol. 13. New York : Wiley and Sons, 1995 : 179-207.
37. Bajaj YPS. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 32. *Cryopreservation of plant germplasm I*. Berlin : Springer Verlag, 1995 : 3-28.
38. Engelmann F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute (sous presse).
39. Mandal BB, Chandel KPS, Dwivedi S. Cryopreservation of yam (*Dioscorea* spp.) shoot apices by encapsulation dehydration. *Cryo-Letters* 1996 ; 17 : 165-74.
40. Malaurie B, Trouslot MF, Engelmann F, et al. Effect of pretreatment conditions on the cryopreservation of *in vitro* cultured yam (*Dioscorea alata* and *D. bulbifera*) shoot apices by encapsulation-dehydration. *Cryo-Letters* 1998 ; 19 : 15-26.
41. Panis B, Schoofs H, Thinh NT, Swennen R. Cryopreservation of proliferating meristem cultures of banana. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute (sous presse).
42. Thinh NT, Takagi H, Sakai A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of five vegetatively propagated tropical monocots by vitrification technique. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute (sous presse).
43. Niino T, Sakai A. Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci* 1992 ; 87 : 199-206.
44. Scottez C. *Cryoconservation après encapsulation-déshydratation d'apex de poirier* (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy) cultivés *in vitro* : effets d'un endurcissement par les basses températures et étude du métabolisme des lipides. Thèse d'Université, Université Pierre-et-Marie-Curie Paris VI, France, 1993 ; 163 p.
45. Towill LE. Survival at low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups *Andigena*, *Phureja*, *Stenotomum*, *Tuberosum*, and other tuber-bearing *Solanum* species. *Cryo-Letters* 1984 ; 5 : 319-26.
46. Lu S, Steponkus PL. Cryopreservation of *Solanum* shoot-tips by vitrification. *Cryobiology* 1994 ; 31 : 569.
47. Benson EE, Wilkinson M, Todd A, et al. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips. *Cryo-Letters* 1996 ; 17 : 119-28.
48. Schäfer-Menuhr A. *Refinement of cryopreservation techniques for potato*. Final Report for the period 1 Sept 1991-31 Aug 1996. Rome : International Plant Genetic Resources Institute. 1996 ; 41 p.
49. Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F, Huet C, et al. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane : effect of freezing procedure and histology. *Cryo-Letters* 1993 ; 14 : 303-8.
50. Berjak P, Pammenter NW. 1994. Recalcitrance is not an all-or-nothing situation. *Seed Sci Res* 1994 ; 4 : 263-4.

51. Pritchard HW, Prendergast FG. Effects of desiccation on the *in vitro* viability of embryos of the recalcitrant seed species *Araucaria hunstenii* K. Schum. *J Plant Physiol* 1986 ; 37 : 1388-97.
52. Krishnapillay B. *Towards the development of a protocol for cryopreservation of embryos of a recalcitrant seed* (*Artocarpus heterophyllus Lam.*). PhD Thesis, Universiti Pertanian Malaysia, 1989 ; 120 p.
53. Chandel KPS, Chaudhury R, Radhamani J, *et al.* Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. *Ann Bot* 1995 ; 76 : 443-50.
54. Krishnapillay B, Marzalina M, Aziah MY. Cryopreservation of excised embryos of rattan manau. In : *Proceedings of the 3rd National Biotechnological Research Conference of National Universities of Malaysia*. Malaysia : Kuala Lumpur, 1992 : 325-30.
55. Normah MN, Chin HF, Hor YL. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muel. *Arg. Pertanika* 1986 ; 9 : 299-303.
56. Pence VC. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. *Cryobiology* 1992 ; 29 : 391-9.
57. Pence VC. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. *Plant Cell Rep* 1991 ; 10 : 144-7.
58. Hong TD, Linington S, Ellis RH. *Seed storage behaviour : a compendium. Handbooks for genebanks No 4*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 1996 ; 656 p.
59. Chin HF, Krishnapillay B Alang Z. Cryopreservation of *Veitchia* and *Howea* palms embryos : non-development of the haustorium. *Cryo-Letters* 1988 ; 9 : 372-9.
60. Zakri AH, Normah MN, Senawi MT, *et al.* *Conservation of plant genetic resources through in vitro methods*. Kuala Lumpur : Forest Research Institute of Malaysia/Malaysian National Committee on Plant Genetic Resources, 1991 ; 270 p.
61. Dumet D, Berjak P, Engelmann F. Cryopreservation of zygotic and somatic embryos of tropical species producing recalcitrant or intermediate seeds. In : Razdan MK, Cocking EC, eds. *Conservation of plant genetic resources in vitro*. Vol. 1. Enfield : M/S Science, 1996 : 153-72.
62. Berjak P, Mycock D, Wesley-Smith J, *et al.* Strategies for *in vitro* conservation of hydrated germplasm. In : Normah MN, Narimah MK, Clyde MM, eds. *In vitro conservation of plant genetic resources*. Serdang : Universiti Kebangsaan Malaysia, 1996 : 19-52.
63. Pence VC. Cryopreservation of recalcitrant seeds. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 32. *Cryopreservation of plant germplasm* I. Berlin : Springer Verlag, 1995 : 29-52.
64. Pritchard HW. Cryopreservation of seeds. In : Day JG, McLellan MR, eds. *Methods in molecular biology*. Vol. 38. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Totowa : Humana Press Inc., 1995 : 133-44.
65. Pence VC. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. In : Benson EE, ed. *Plant conservation biotechnology*. London : Taylor & Francis, 1999 : 227-50.
66. Gonzalez-Benito ME, Martin C, Iriondo JM, *et al.* Conservation of rare and endangered plants endemic to Spain. In : Benson EE, ed. *Plant conservation biotechnology*. London : Taylor & Francis, 1999 : 251-64.
67. Towill LE, Eberhart S, Roos E, *et al.* Cryopreservation at the USDA-ARS national seed storage laboratory. In : Abstracts JIRCAS/IPGRI Joint international workshop 1998, *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*, 20th-23rd October, 1998, Tuskuba, Japan, 1998 : P50.
68. Mandal BB. Cryopreservation research in India : current status and future perspectives. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 2000 (sous presse).
69. Touchell DH, Dixon KW. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. *Ann Bot* 1994 ; 40 : 541-6.
70. Pence VC. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. *Seed Sci Technol* 1991 ; 19 : 235-51.
71. Dussert S, Chabrilange N, Vasquez N, *et al.* Cryopreservation of seeds for long-term conservation of coffee germplasm and elite varieties : successful application at CATIE. *Proceedings of the 18th International Conference on Coffee Science (ASIC'99)*, Helsinki, 2-6 August 1999 (sous presse).
72. Dussert S, Chabrilange N, Engelmann F, *et al.* Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds : importance of the precooling temperature. *Cryo-Letters* 1997 ; 18 : 269-76.
73. Forsline PL, McFerson JR, Lamboy WF, Towill LE. Development of base and active collections of *Malus* germplasm with cryopreserved dormant buds. *Acta Hort* 1999 ; 484 : 75-8.
74. Niino T. Cryopreservation of germplasm of mulberry. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 32. *Cryopreservation of plant germplasm* I. Berlin : Springer Verlag, 1995 : 102-13.
75. Towill LE, Walters C. Cryopreservation of pollen. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 2000 (sous presse).
76. Ganeshan S, Rajashekar PE. Current status of pollen cryopreservation research : relevance to tropical agriculture. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 2000 (sous presse).
77. Spencer M. The challenges of developing cryopreservation strategies to suit the requirements of a large industrial *in vitro* plant cell collection. In : Abstracts *Cryo'99, World congress of cryobiology*, Marseille, France, 12-15 juillet 1999 : 245.
78. Cyr DR. Cryopreservation : roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 2000 (sous presse).
79. Florin B, Brulard E, Lepage B, *et al.* Establishment of a cryopreserved coffee germplasm bank. In : Abstracts *Cryo'99, World congress of cryobiology*, Marseille, France, 12-15 juillet 1999 : 167.
80. Dumet D. *Cryoconservation des massifs d'embryons somatiques de palmier à huile* (*Elaeis guineensis Jacq.*) par *déshydratation-vitrification*. *Etude du rôle du saccharose pendant le prétraitement*. Thèse d'Université. Université Paris 6, France, 1994 ; 115 p.
81. Golmirzaie A, Panta A. Advances in potato cryopreservation at the International Potato Center, Peru. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 2000 (sous presse).
82. Reed BM. Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 2000 (sous presse).
83. Roca W, Debouck D, Escobar R, Mafla G. Cryopreservation and cassava germplasm conservation at CIAT. In : Engelmann F, Takagi H, eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications*. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 2000 (sous presse).
84. Hummer KE, Reed BM. Establishment and operation of a temperate clonal field genebank. In : Engelmann F, ed. *Proceedings of a consultation meeting on the establishment and management of field and in vitro germplasm collections*. 16-19 January, 1996, Cali, Colombia. Rome : International Plant Genetic Resources Institute, 2000 (sous presse).

## Résumé

La cryoconservation (stockage à la température de l'azote liquide, - 196 °C) est la seule technique permettant d'assurer la conservation à long terme des ressources génétiques des espèces végétales multipliées végétativement, des espèces à semences récalcitrantes et des espèces rares et menacées, ainsi que des produits de la biotechnologie. La résistance à la congélation a été prouvée pour de nombreux matériels (semences orthodoxes et intermédiaires, bourgeons dormants, pollen, cultures *in vitro*). Le développement de la cryoconservation est beaucoup plus avancé pour les espèces multipliées végétativement que pour celles à semences récalcitrantes. L'emploi en routine de la cryoconservation est encore limité. Cependant, les progrès réalisés récemment dans la mise au point de techniques simples et performantes de cryoconservation et dans la compréhension des phénomènes physiques et biochimiques y afférant devraient accroître son emploi dans les programmes de conservation des ressources génétiques et de biotechnologie.