

**E.N.S.S.I.B.**  
**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE**  
**DES SCIENCES DE L'INFORMATION**  
**ET DES BIBLIOTHEQUES**

**UNIVERSITE**  
**CLAUDE BERNARD**  
**LYON I**

**DESS en INFORMATIQUE DOCUMENTAIRE**

**NOTE de SYNTHESE**

**“L’embryogenèse somatique chez les gymnospermes,  
à partir de 1988”**

**REZZOUQI-CATHENOD Marie-Line**

**Sous la direction de M. ROHR**  
**Enseignant-Chercheur**  
**Laboratoire “Interactions Plantes-Champignons et Micropropagation”**  
**Université Claude Bernard**  
**41-43, avenue du 11 novembre 1918**  
**69100 Villeurbanne**

**1992**

ED  
23

**E.N.S.S.I.B.**  
**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE**  
**DES SCIENCES DE L'INFORMATION**  
**ET DES BIBLIOTHEQUES**

**UNIVERSITE**  
**CLAUDE BERNARD**  
**LYON I**

## **DESS en INFORMATIQUE DOCUMENTAIRE**



## **NOTE de SYNTHESE**

**“L’embryogenèse somatique chez les gymnospermes,  
à partir de 1988”**

**REZZOUQI-CATHENOD Marie-Line**

**Sous la direction de M. ROHR**  
**Enseignant-Chercheur**  
**Laboratoire “Interactions Plantes-Champignons et Micropropagation”**  
**Université Claude Bernard**  
**41-43, avenue du 11 novembre 1918**  
**69100 Villeurbanne**

1992  
ID  
23

**1992**

Je remercie Mr Rohr et Mr Bruchet  
de m'avoir confié ce sujet fort intéressant.

Que Mme Chevalier et Mr Lardy  
soient vivement remerciés  
pour leur aide et leurs précieux conseils.

“L’embryogenèse somatique chez les gymnospermes, à partir de 1988”

REZZOUQI-CATHENOD Marie-Line

**RESUME :**

Une première partie détaille les différentes étapes et les méthodes de la recherche documentaire concernant l’embryogenèse somatique chez les gymnospermes après 1988.

La seconde partie fait le point des recherches effectuées sur ce thème, tant sur ses aspects fondamentaux (anatomiques, biochimiques...), que sur le plan expérimental (amélioration des conditions de culture) ou sur ses applications.

**DESCRIPTEURS :**

embryon somatique, gymnospermae, embryon, haploïdie, culture tissu, développement embryonnaire, recherche documentaire, article synthèse.

**ABSTRACT :**

A first part deals with the various steps and methods for the document retrieval about somatic embryogenesis in gymnosperms after 1988.

The second part summaries the researches on this subject, both on its fundamental aspects (anatomical, biochemical...) and on the experimental point of views (culture’s conditions improvement) or on its applications.

**KEYWORD :**

somatic embryo, gymnospermae, embryo, haploidy, tissue culture, embryonic development, document retrieval, review.

# TABLE DES MATIERES

## **1-1ère PARTIE : RECHERCHE DOCUMENTAIRE**

1.1-ENTRETIEN AVEC L'UTILISATEUR :.....	1
1.1.1.-Précision de la question et choix des termes à employer : .....	1
1.1.2.-Intérêt de cette recherche documentaire pour l'utilisateur: .....	3
1.2.-RECHERCHE MANUELLE : .....	3
1.3.-CHOIX DES BASES DE DONNEES :.....	3
1.4.-INTERROGATION DE LA BASE PASCAL :.....	3
1.4.1.-Présentation de la base: .....	3
1.4.2.-Choix de la stratégie et résultats : .....	4
1.5.-INTERROGATION DE LA BASE BIOSIS:.....	5
1.5.1.-Présentation de la base: .....	5
1.5.2.-Choix de la stratégie et résultats : .....	6
1.6.-INTERROGATION DE LA BASE CAB: .....	7
1.6.1.-Présentation de la base: .....	7
1.6.2.-Choix de la stratégie et résultats : .....	8
1.7.-INTERROGATION DE LA BASE CHEMICAL ABSTRACT: .....	9
1.7.1.-Description de la base : .....	9
1.7.2.-Stratégie d'interrogation et résultats : .....	10
1.8.-INTERROGATION DE LA BASE EPAT: .....	10
1.8.1.-Description de la base: .....	10
1.8.2.-Stratégie d'interrogation:.....	10
1.9.-COMPARAISON ENTRE LES DIFFERENTES BASES .....	11
1.10.-COMPARAISON AVEC LA BIBLIOGRAPHIE DE L'ARTICLE DE SYNTHESE DE TAUTORUS [70] :.....	11
1.11.-OBTENTION DES DOCUMENTS PRIMAIRES : .....	12

## **2-2ème PARTIE : SYNTHÈSE**

2.1.-INTRODUCTION :.....	13
2.2.-HISTORIQUE : .....	13
2.3.-LES ASPECTS MORPHOLOGIQUES : .....	13

2.4.-LES STADES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE : .....	13
2.5.-LE MECANISME DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE : .....	14
2.6.-L'ORIGINE DES STRUCTURES EMBRYONNAIRES : .....	14
2.7.-L'ULTRASTRUCTURE DES EMBRYONS SOMATIQUES : .....	15
2.8.-LES ASPECTS BIOCHIMIQUES : .....	15
2.9.-LES ASPECTS GENETIQUES : .....	16
2.10.-FACTEURS AYANT UNE INFLUENCE SUR L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE : .....	17
2.10.1.-CHOIX DES ESPECES ET DES GENRES : .....	17
2.10.2.-CHOIX DES EXPLANTS : .....	17
2.10.2.1.-Degré de maturité de l'explant mis en culture : .....	17
2.10.2.2.-Traitement de l'explant mis en culture : .....	18
2.10.3.-CONDITIONS DE CULTURE POUR L'INDUCTION DE L'EMBRYOGENESE : .....	19
2.10.3.1.-Milieux de culture de base : .....	19
2.10.3.2.-Régulateurs de croissance : .....	19
2.10.3.3.-Modifications du milieu de culture de base : .....	20
2.10.3.4.-Autres conditions de culture : .....	20
2.10.4.-CONDITIONS DE CULTURE POUR LA MATURATION DES EMBRYONS ET LE DEVELOPPEMENT EN PLANTULES : ...	21
2.10.4.1.-Choix des embryons : .....	21
2.10.4.2.-Traitement à l'acide abscissique : .....	21
2.10.4.3.-Dessèchement partiel à haute humidité relative : .....	22
2.10.4.4.-Pression osmotique : .....	22
2.10.4.5.-Pression en O <sub>2</sub> et CO <sub>2</sub> : .....	22
2.10.4.6.-Autres conditions : .....	23
2.10.5.-ETABLISSEMENT AU SOL : .....	23
2.11.-CULTURES EN SUSPENSION : .....	24
2.12.-CULTURES DE PROTOPLASTES : .....	24
2.13.-MANIPULATIONS GENETIQUES : .....	25
2.14.-CONSERVATION DU TISSU EMBRYOGENE : .....	25
2.15.-CONCLUSION .....	26

## ANNEXES

## BIBLIOGRAPHIE

1<sup>ère</sup> PARTIE :

RECHERCHE

DOCUMENTAIRE

## 1.1-ENTRETIEN AVEC L'UTILISATEUR :

### 1.1.1.-PRECISION DE LA QUESTION ET CHOIX DES TERMES A EMPLOYER :

Le terme "gymnosperme" fait partie de la taxonomie des végétaux. C'est un embranchement correspondant essentiellement à la classe des conifères. Seuls quelques espèces très peu représentées, exotiques pour la plupart, font partie des gymnospermes sans être des conifères: les ginkgoales et les cycadales en sont les plus remarquables.

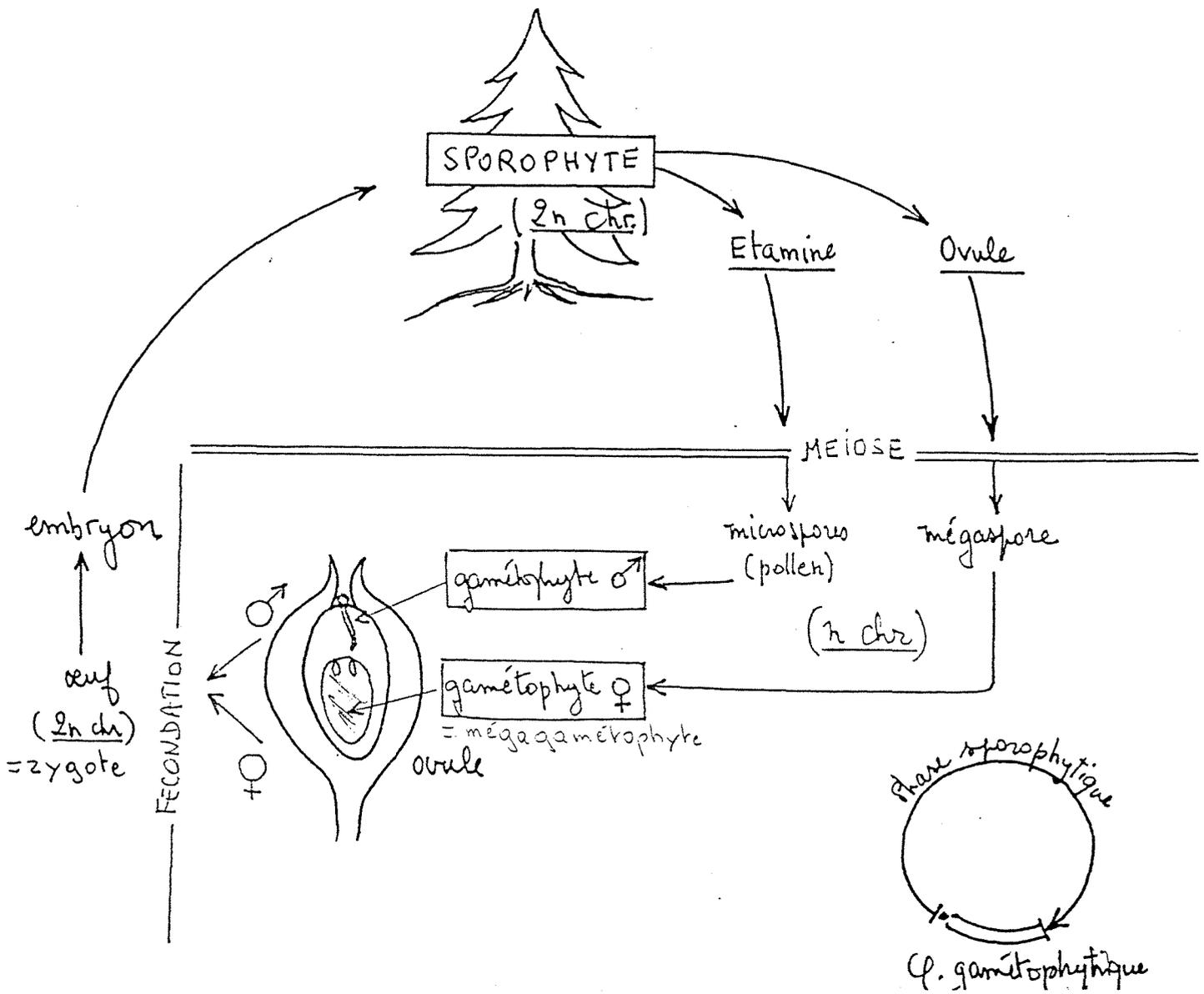
L'embryogenèse somatique correspond à l'obtention par culture *in vitro* d'embryons à partir de cellules végétatives (= cellules autres que les cellules sexuelles ou gamètes) par opposition à l'embryogenèse zygotique qui correspond à l'obtention d'un embryon à partir d'un zygote, c'est à dire l'oeuf obtenu par fusion des 2 gamètes.

L'embryon somatique était autrefois appelé embryon adventif ; Mais ce terme n'est plus employé depuis de nombreuses années car il prête à confusion

L'embryogenèse somatique est à distinguer également de l'embryogenèse gamétophytique (= haploïde). En effet l'embryogenèse somatique est diploïde ( $2n$  chromosomes), alors que l'embryogenèse gamétophytique est haploïde, elle est obtenue à partir des tissus du gamétophyte, dont les cellules comptent  $n$  chromosomes (cf schéma ci-après).

Or la discussion du sujet avec M Rohr m'a permis de réaliser qu'il s'intéresse également à l'embryogenèse haploïde, bien qu'elle ne fasse pas partie de l'embryogenèse somatique. J'en ai donc tenu compte dans ma recherche documentaire. Cependant, je n'ai pas jugé nécessaire de modifier le titre de ma synthèse car les chercheurs eux-mêmes ne font pas toujours strictement cette distinction de vocabulaire : par exemple l'article de synthèse [ 70] titré "somatic embryogenesis in conifers" traite également d'embryogenèse haploïde, qui de toute façon n'a fait que très peu l'objet de recherches expérimentales.

Le schéma ci-après permet de comprendre la distinction entre les différents types d'embryogenèse.



### 1.1.2.-.INTERET DE CETTE RECHERCHE DOCUMENTAIRE POUR L'UTILISATEUR:

D'une part M Rohr aimerait comparer les résultats obtenus en interrogeant différentes bases de données.

En effet il a la possibilité d'interroger gratuitement le CD ROM de PASCAL à la Bibliothèque Universitaire .Or les autres bases n'étant pas gratuites il souhaiterait savoir si elles sont vraiment plus performantes dans son domaine avant de faire un choix.

D'autre part, son laboratoire prépare actuellement une culture d'ovules qui serviront à une expérience d'embryogenèse somatique .

A plus long terme, il a d'autres projets de recherche à partir d'embryons somatiques liés à l'interaction avec des champignons ( mycorhize ), puisqu'il fait partie du laboratoire "interactions plantes-champignons et micropropagation" .

### 1.2.-RECHERCHE MANUELLE :

M Rohr m'a prêté quelques articles sur le sujet ainsi qu'un ouvrage [79] , qui m'ont donné de premières indications sur les termes à employer et m'ont permis de me familiariser avec la question.

Une recherche manuelle plus approfondie aurait été longue et fastidieuse, et n'aurait pas apporté les articles les plus récents.

### 1.3.-CHOIX DES BASES DE DONNEES :

J'ai choisi d'interroger d'abord la base généraliste PASCAL, pour avoir un premier aperçu, puis une base plus spécialisée en biologie : BIOSIS.

M Rohr m'a conseillé de contacter l'AFOCEL ( Association Forêt-Cellulose -Nangis-77),car leur documentation est très bien fournie sur le sujet. La documentaliste de

l'AFOCEL m'a informée par courrier qu'elle interroge en priorité PASCAL, BIOSIS et CAB. Par conséquent, j'ai consulté également CAB, base spécialisée en agriculture.

Enfin, j'ai eu l'occasion d'interroger Chemical Abstract et EPAT dans le cadre des cours de Mme Chevalier à l'INSERM.

### 1.4.-INTERROGATION DE LA BASE PASCAL :

#### 1.4.1.-PRESENTATION DE LA BASE:

Producteur	: INIST-CNRS, FRANCE.
Domaine	: Sciences et Techniques.
Nature	: Références bibliographiques.
Données	: Analyse de tous les articles de périodiques majeurs français et étrangers ainsi que de rapports scientifiques, thèses, comptes-rendus de congrès. Volume : 7,7 millions de références (800000 sur DIALOG) + 430000 ref/an.
Début	: 1973 (1986 pour DIALOG).

Mise à jour : Mensuelle.  
 Aides : Profils documentaires, reproduction des documents signalés, lexique, manuel d'utilisation.  
 Serveurs : QUESTEL  
 DIALOG  
 IRS-ESA

La base PASCAL a été interrogée sur le serveur DIALOG dans le cadre des TP.

1.4.2.-CHOIX DE LA STRATEGIE ET RESULTATS :

Recherche sur l'embryogenèse somatique au sens strict:

J'ai consulté le lexique de PASCAL et j'ai constaté que le terme "embryon somatique" est un descripteur.

Le terme "gymnospermae" est descripteur également, mais j'ai remarqué en visualisant quelques références qu'il est aussi dans le champ "Broader term" (BT).

J'ai vérifié que le champs DE est plus large et contient le champ BT en faisant :

S gymnospermae/BT NOT gymnospermae/DE

J'ai obtenu 0 réponses.

Il est inutile d'employer les termes équivalents en anglais lorsqu'on interroge uniquement par descripteurs, puisque PASCAL est indexé en français et en anglais.

Ma stratégie définitive a donc été :

S EMBRYON SOMATIQUE/DE AND GYMNOSPERMAE/DE AND PY > =1988

Résultat:

Question : .....	Réponse :
1 EMBRYON SOMATIQUE/DE .....	842
2 GYMNOSPERMAE/DE.....	15387
3 1 AND 2 .....	66
4 3 AND PY > =1988 .....	36

Toutes les références obtenues sont pertinentes.

Recherche sur l'embryogenèse haploïde:

Une interrogation par auteur m'a permis de visualiser les références des articles dont disposait M Rohr, en format 8 de manière à observer les descripteurs.

J'ai constaté que les descripteurs utilisés dans ce cas sont peu précis et qu'ils ne permettent pas de cerner exactement le sujet.

Il est donc nécessaire d'interroger sur le "basic index".

Stratégie:

S (HAPLOID? OR GAMETOPH?TI? OR MEGAGAMETOPH?TI?)(2N)EMBRYO?

S GYMNOSPERMAE/DE AND PY > =1988

S S1 AND S2

## Résultat:

2385 HAPLOID?  
156 GAMETOPH?T?  
3 MEGAGAMETOPH?TI?  
59071 EMBRYO?  
175 (HAPLOID? OR GAMETOPH?TI? OR MEGAGAMETOPH?TI?) (2N) EMBRYO?  
  
15387 GYMNOSPERMAE/DE  
1327620 PY > =1988  
3065 GYMNOSPERMAE/DE AND PY > 1988  
  
175 S1  
3065 S2  
3 S1 and S2

Les 3 références sont pertinentes (et ne faisaient pas partie des 36 références obtenues par la stratégie précédente).

## 1.5.-INTERROGATION DE LA BASE BIOSIS:

### 1.5.1.-PRESENTATION DE LA BASE:

Producteur : Biosciences Information Service (BIOSIS), USA.  
Domaines : Biologie, Médecine.  
Nature : Références bibliographiques.  
Données : Articles de 9000 périodiques  
Actes de congrès  
Rapports de recherche  
Ouvrages  
Brevets américains.  
Volume : 5,7 millions + 480000 ref/an.  
Début : Selon le serveur.  
Mise à jour: Mensuelle.  
Aides : "Biosis Previews Search Guide" : un volumineux guide de recherche, comportant le "Master Index" : lexique, "Serial Sources for the BIOSIS Database" : liste des périodiques dépouillés, "Bioscène" : périodique, "Biosis Training", ...  
Serveurs : DIALOG  
IRS-ESA  
DATA-STAR  
BRS  
DIMDI  
MEAD  
STN

La base BIOSIS a été interrogée sur DIALOG à l'ENSSIB.

### 1.5.2.-CHOIX DE LA STRATEGIE ET RESULTATS :

La base BIOSIS présente une particularité : les concept-codes.

Ils permettent de cerner le sujet par domaines.

Mais dans le cas particulier de mon sujet, l'utilisation des concept-codes ne m'a pas paru intéressante.

En effet, ils sont très larges et doivent être combinés avec une interrogation sur le basic index ou par descripteurs, mais ils n'améliorent pas ma stratégie d'interrogation.

De plus les concept-codes utilisés varient d'une référence à l'autre, car l'embryogenèse somatique peut être considérée sous différents aspects : biochimiques, cellulaires, milieu de culture, ...

L'utilisation des concept-codes risquerait d'introduire une part importante de silence.

J'ai remarqué que les descripteurs utilisés sur BIOSIS sont beaucoup plus précis que sur les autres bases : eux aussi varient beaucoup d'une référence à l'autre.

J'ai donc choisi d'interroger sur le basic index.

Il existe également sur BIOSIS un champ "Biosystematic codes" et un champ "Super Taxa" qui indiquent les groupes taxonomiques concernés par l'article, soit par un code, soit par leur nom en anglais. Le préfixe "BC" porte sur les 2 champs à la fois.

Toutes les références que j'ai visualisées présentent le terme "gymnosperms" dans le champ "Super Taxa".

BIOSIS est une base anglaise, tous les termes doivent être employés en anglais.

Ma stratégie d'interrogation définitive a donc été:

S SOMATIC(2W)EMBRYO? AND BC = GYMNOSPERMS AND PY > = 1988

#### Résultat:

12479 SOMATIC

55399 EMBRYO?

1223 SOMATIC (2W) EMBRYO?

21461 BC = GYMNOSPERMS

2015703 PY > = 1988

66 SOMATIC (2W) EMBRYO? AND BC = GYMNOSPERMS AND PY > = 1988

#### Puis:

S (HAPLOID OR GAMETOPHYTIC OR MEGAGAMETOPHYTIC) (2W) EMBRYO?

S BC = GYMNOSPERMS AND PY > = 1988

S S1 AND S2

Résultat:

2816 HAPLOID  
329 GAMETOPH?TIC  
14 MEGAGAMETOPH?TIC  
55399 EMBRYO?  
80 (HAPLOID OR GAMETOPH?TIC OR MEGAGAMETOPH?TIC) (2W)  
EMBRYO?

21461 BC = GYMNOSPERMS  
2015703 PY > = 1988  
9255 BC = GYMNOSPERMS AND PY > = 1988

80 S1  
9255 S2  
2 S1 AND S2

Les 2 références sont pertinentes, déjà trouvées sur PASCAL.

**1.6.-INTERROGATION DE LA BASE CAB:**

**1.6.1.-PRESENTATION DE LA BASE:**

Producteur : Commonwealth Agricultural Bureau, ROYAUME-UNI  
Domaines : Agriculture : tous les aspects des sciences agricoles dont les sciences forestières  
Nature : Références bibliographiques  
Données : Articles de 8500 périodiques, livres, rapports techniques, thèses  
Volume : 2,2 millions + 150000 ref/an  
Début : selon serveur  
Mise à jour : mensuelle  
Aides : CAB thesaurus  
CAB Abstracts Online Manual  
CAB Abstract Online News letter  
CAB serial checklist  
Serveurs : DIALOG  
IRS-ESA  
STN  
DIMDI  
CABI  
CAN-OLE  
BRS

La base CAB a été interrogée sur DIALOG à l'ENSSIB

### 1.6.2.-CHOIX DE LA STRATEGIE ET RESULTATS :

Ne disposant pas du thésaurus de CAB au moment de l'interrogation, j'ai commencé par observer l'indexation de références déjà connues.

J'ai constaté que le terme "somatic embryogenesis" et le terme "conifers" sont descripteurs.

Le terme "gymnosperm" n'est pas utilisé.

De toute façon, comme je l'ai précisé en introduction, très peu d'espèces font partie des gymnospermes et pas des conifères, et d'après les références obtenues précédemment, il semble qu'elles n'aient pas fait récemment l'objet de recherches en embryogenèse somatique.

Ma stratégie a donc été:

S SOMATIC EMBRYOGENESIS/DE AND CONIFERS/DE AND PY > =1988

#### Résultats :

450 SOMATIC EMBRYOGENESIS/DE

7299 CONIFERS/DE

316601 PY > =1988

16 SOMATIC EMBRYOGENESIS/DE AND CONIFERS/DE AND PY > =1988

Toutes les références sont pertinentes.

Ce faible nombre par rapport aux 2 autres bases m'a intriguée

Je suis donc allée consulter le thésaurus de CAB à l'URFIST et j'ai découvert que le terme "somatic embryogenesis" ne figure pas dans ce thésaurus de 1988. Il a du être introduit après 1988. Ce n'est malheureusement pas indiqué entre parenthèses dans le champ "keyword" ; ce qui est regrettable car lorsqu'on interroge une base épisodiquement, on n'utilise pas nécessairement le thésaurus, qui coûte assez cher.

J'ai pu essayer une nouvelle stratégie : (CAB étant une base anglaise, tous les termes doivent être employés en anglais).

S SOMATIC(2W)EMBRYO? AND CONIFERS/DE AND PY > =1988

Résultats : 34 références.

Je ne les ai pas visualisées pour des questions de prix. Comme les 18 références supplémentaires datent de 1988-89, M.Rohr n'a pas jugé nécessaire de refaire cette interrogation en détail, n'ayant pas de budget pour l'interrogation des bases de données et ayant clairement précisé lorsqu'il m'a donné le sujet qu'il ne pourrait les financer.

Stratégie concernant l'embryogenèse haploïde :

S (HAPLOID OR GAMETOPHYTIC OR MEGAGAMETOPHYTIC) (2W) EMBRYO?

S CONIFERS/DE AND PY > = 1988

Résultat :

1914 HAPLOID

198 GAMETOPHYTIC

10 MEGAGAMETOPHYTIC

17811 EMBRYO?

88 (HAPLOID OR GAMETOPHYTIC OR MEGAGAMETOPHYTIC) (2W)  
EMBRYO?

7299 CONIFERS/DE

316601 PY > = 1988

4051 CONIFERS/DE AND PY > = 1988

88 S1

4051 S2

3 S1 AND S2

Les 3 références sont pertinentes, les mêmes que sur PASCAL.

1.7.-INTERROGATION DE LA BASE CHEMICAL ABSTRACT:

1.7.1.-DESCRIPTION DE LA BASE :

Producteurs : Chemical Abstract Service (USA)

Domaines : CHIMIE

Tous les aspects de la chimie et ses applications aux différents domaines industriels

Nature : Références bibliographiques

Données : Articles extraits de 14000 périodiques représentant 150 pays et 50 langues (68% en anglais)

Brevets provenant de 20 pays

Livres

Comptes-rendus de congrès, thèses, rapports techniques

Volume : 9 millions + 500.000 ref/an

Début : 1967

Mise à jour : Bimensuelle

Aides : CA Selects (110 profils standards)

CA Grouping Sections (5 grands thèmes)

Index Guide

CASSI = CAS Source Index : répertorie les journaux signalés et les bibliothèques où ils sont disponibles.

Ontap-Online Training : sous ensemble non mis à jour destiné aux essais.  
etc...

Serveurs : BRS  
IRS-ESA  
DIALOG  
ORBIT  
QUESTEL  
DATA-STAR  
STN

Chemical Abstract a été interrogée sur QUESTEL à l'INSERM avec l'aide de Mme Chevalier, dans le cadre des cours de "recherche documentaire spécialisée" (groupe Biomédical).

#### 1.7.2.-STRATEGIE D'INTERROGATION ET RESULTATS :

Ne disposant pas du thésaurus de Chemical Abstract, nous avons interrogé sur le Basic Index.

1 : SOMATIC/T 2AV EMBRYO +/T  
2 : 1 ET DP > = 1988  
3 : 2 ET (CONIFER +/T OU PINUS/T OU PICEA/T OU LARCH +/T)

Résultats : 14 références, toutes pertinentes (les détails n'ont pas été imprimés par Questel).

#### 1.8.-INTERROGATION DE LA BASE EPAT:

##### 1.8.1.-DESCRIPTION DE LA BASE:

Producteurs : INPI (France).  
Domaines : Brevets  
Multidisciplinaire.  
Nature : Références bibliographiques  
Données : Toutes les demandes européennes de brevets publiées ainsi que les EURO-PCT (Patent Cooperation Treaty) comprenant toutes les informations du Registre Européen des Brevets.  
Volume : 350.000 + 50.000 ref/an.  
Début : 1978.  
Mise à jour : Hebdomadaire  
Aides : CIB : Classification Internationale des Brevets, Index des mots-clé de la CIB.  
Serveurs : QUESTEL.

La base EPAT a été interrogée sur QUESTEL à l'INSERM avec l'aide de Mme Chevalier.

##### 1.8.2.-STRATEGIE D'INTERROGATION:

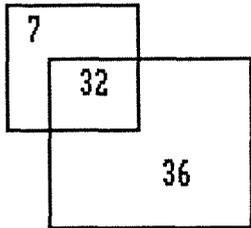
SOMATIC/T ET EMBRYO +/T

Résultats : 8 réponses, dont une seule concerne l'embryogenèse somatique chez les gymnospermes (les autres : pas chez les gymnospermes).

## 1.9.-COMPARAISON ENTRE LES DIFFERENTES BASES

Schéma :

PASCAL



BIOSIS

Ne disposant pas du détail des 18 références de CAB de 88-89, il est impossible de comparer CAB avec les autres bases.

Sur la base Chemical Abstract, je n'ai obtenu qu'une seule référence qui n'était pas déjà sur l'une des 3 autres bases [26].

Le brevet indiqué dans EPAT est également signalé dans CAB, pas dans les autres bases [34].

Il est important de noter que l'article de synthèse [70] qui m'a beaucoup aidée et a beaucoup intéressé M Rohr n'est apparu que sur BIOSIS.

J'ai vérifié qu'il n'est effectivement pas sur PASCAL en consultant à la Bibliothèque Universitaire le CD ROM de PASCAL portant sur la période : janvier à septembre 1991

## 1.10.-COMPARAISON AVEC LA BIBLIOGRAPHIE DE L'ARTICLE DE SYNTHÈSE DE TAUTORUS [70] :

Les articles cités dans cette bibliographie et pas dans la mienne :

- sont parfois antérieurs à 1988.
- ne concernent pas les gymnospermes.
- sont des livres.
- sont très généraux, ne concernent pas uniquement l'embryogenèse somatique.
- traitent d'embryogenèse zygotique, car TAUTORUS établit une comparaison entre les 2.
- ou traitent uniquement des expérimentations (génétiques ou autres) effectuées sur des cultures d'embryons somatiques, donc postérieures à l'embryogenèse somatique proprement dite.

Sept articles traitent bien d'embryogenèse somatique ou haploïde chez les gymnospermes. Parmi ceux-ci, 3 ont été édités dans des revues qui n'ont été citées dans aucune des 4 bases interrogées : elles ne sont peut-être pas dépouillées par celles-ci. Pour les autres, les termes utilisés lors des interrogations n'apparaissent pas dans le titre et peut-être pas dans le résumé. C'est le risque inévitable lorsqu'il n'existe pas de descripteur permettant de cerner le sujet et qu'on recherche les termes dans le basic index.

Par contre, j'ai obtenu 22 articles qui ne sont pas dans la bibliographie de TAUTORUS, dont 9 sont de 1991 et 8 sont des résumés de comptes-rendus de congrès.

#### **1.11.-OBTENTION DES DOCUMENTS PRIMAIRES :**

J'ai consulté le CD ROM du CCN (MYRIADE) afin de localiser les documents primaires. La plupart se trouvaient à la bibliothèque de RHONE-POULENC Agrochimie, où j'ai pu les photocopier (la photocopie est gratuite pour les étudiants )

Quelques-uns ont été photocopiés à la B.U. Lyon-Sciences

8 ont été commandés par le PEB.

18 ont été demandés directement aux auteurs sous forme de TAP (Tirés à part), j'en ai reçu 12.

2<sup>ème</sup> PARTIE :

SYNTHESE

## 2.1.-INTRODUCTION :

L'embryogenèse somatique représente une méthode très prolifique de multiplication *in-vitro* des végétaux. De plus dans certains cas les plantules obtenues ne sont pas parfaitement conformes à la souche mère, il est donc possible d'effectuer une sélection de variants sur les nombreux embryons obtenus.

D'autre part, les protoplastes qui sont utilisés pour des manipulations génétiques permettent de régénérer des embryons somatiques transformés.

Les embryons somatiques peuvent aussi servir au stockage à long terme des végétaux.

## 2.2.-HISTORIQUE :

L'embryogenèse somatique a été étudiée chez les conifères à partir de 1985 sur *Picea abies* (Hakman and von Arnold-1985, cités par [70]). Des embryons zygotiques immatures ont été utilisés comme explants, mis en culture sur un milieu contenant des hormones de croissance : auxine et cytokinine.

Puis d'autres espèces, d'autres explants, d'autres conditions de cultures furent expérimentés.

## 2.3.-LES ASPECTS MORPHOLOGIQUES :

Le tissu embryogène présente un aspect très caractéristique : il est blanchâtre, luisant, translucide et mucilagineux ; contrairement au tissu non embryogène qui reste vert.

Les embryons somatiques se détachent facilement du cal avec lequel ils n'ont aucune liaison vasculaire (ce qui permet de les distinguer facilement des bourgeons adventifs). Ils présentent une organisation bipolaire avec un pôle caulinaire et un pôle racinaire, typique des structures embryonnaires. Dans le cas des conifères, le pôle racinaire (= basal) est d'abord occupé par un suspenseur auquel l'embryon est comme suspendu avant que ne se différencie la première racine.

## 2.4.-LES STADES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE :

Afin de clarifier le vocabulaire et de permettre ainsi des comparaisons plus rigoureuses, von Arnold et Hakman ont défini en 1988 [3] quatre stades au cours de l'embryogenèse somatique (stades décrits aussi par Hakman and von Arnold, 1988 [35]) :

Stade 1 :

Une région embryonnaire constituée de cellules petites au cytoplasme dense.

Une région du suspenseur constituée de cellules longues et très vacuolisées.

Stade 2 :

La région embryonnaire devient proéminente, plus opaque, avec une surface lisse et luisante.

Stade 3 :

Les cotylédons sont visibles.

Les embryons ressemblent aux embryons zygotiques.

Stade 4 :

Les cotylédons et l'hypocotyle se sont allongés.

On observe un développement radriculaire rudimentaire.

Les cultures passent d'abord par le stade d'un cal embryogène (ou masse embryogène) formé de cellules embryonnaires et de cellules du suspenseur.

Mais dans certains cas [17] [49], il a été observé le développement spontané d'embryons somatiques sans passer par le stade d'un tissu embryogène.

## **2.5.-LE MECANISME DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE :**

Il est encore peu connu.

Trois possibilités de mécanisme de l'embryogenèse somatique ont été suggérées par Hakman et Al en 1987 (cités par [35]) et confirmés depuis par d'autres auteurs. Il varie selon le type d'explant utilisé.

1ère possibilité : [3] [37] (Nagmani et al. en 1987, cités par [70])

L'embryogenèse somatique provient de cellules isolées ou de petits agrégats de cellules par des divisions asymétriques qui délimitent une région embryonnaire et une région du suspenseur.

2ème possibilité : [3] [66]

L'embryogenèse somatique se développe à partir de petites cellules méristématiques à l'intérieur du suspenseur. Ce qui conduit à la formation de plusieurs embryons liés au même suspenseur.

Ces cellules méristématiques du suspenseur proviennent de la division assymétrique de cellules du suspenseur ou de cellules méristématiques de la région embryonnaire qui ne se sont pas allongées quand elles ont été intégrées au suspenseur.

3ème possibilité : [1] [3] [4] [66]

Les nouveaux embryons somatiques proviennent de la division des embryons existant ; cette division se produisant au niveau de la région embryonnaire, par un mécanisme proche de la polyembryonnie par clivage, fréquente chez les embryons zygotiques de conifères.

Fowke et al., en 1990 [30], émet l'hypothèse que l'embryogenèse somatique est identique à l'embryogenèse zygotique pendant les stades précoces.

## **2.6.-L'ORIGINE DES STRUCTURES EMBRYONNAIRES :**

A été étudiée par Mo et Von Arnold en 1991 avec des semis de 18 à 36 jours [52]. Les structures embryonnaires peuvent se différencier à partir de l'hypocotyle ou des cotylédons de l'explant mis en culture.

Elles sont issues de cellules épidermiques ou subépidermiques, ou parfois de cellules corticales.

Lelu et al. en 1990 [50], suggèrent qu'il existe 2 populations cellulaires parmi ces cellules épidermiques et subépidermiques : l'une sensible à un rapport auxine/cytokinine élevé (12/1 ou 24/1) ; l'autre sensible à un prétraitement avec un rapport cytokinine/auxine élevé (90/1), ce prétraitement conduisant à une embryogenèse s'il est de courte durée (1 semaine), à la formation de bourgeons adventifs s'il est plus long.

## **2.7.-L'ULTRASTRUCTURE DES EMBRYONS SOMATIQUES :**

Elle n'a été étudiée que chez *Picea glauca* [30] [35] et *Larix decidua* [63]. Dans le cas de *Larix decidua*, les embryons étudiés sont haploïdes, issus de la culture du mégagamétophyte.

Chez *Picea glauca* :

Les cellules de la région embryonnaire sont petites, le cytoplasme est dense, les vacuoles nombreuses et petites, les nombreux dictyosomes, mitochondries et réticulum endoplasmique rugueux indiquent une croissance rapide. Des figures mitotiques sont fréquemment observées, les cellules filles s'ajoutent à celles de la région embryonnaire ou forment de nouvelles cellules du suspenseur.

Les cellules du suspenseur sont longues et très vacuolisées. Elles sont caractérisées par une bande cytoplasmique périphérique étroite. Dans la partie supérieure du suspenseur, les cellules semblent métaboliquement actives, elles contiennent un réseau de filaments d'actine. Dans la partie inférieure, les cellules sont apparemment senescentes.

Chez *Larix decidua* :

Pendant les premiers stades de développement les cellules sont, petites ou grandes, toutes très vacuolisées et les plastes et mitochondries sont peu différenciés.

Puis au cours du développement : les petites cellules forment la région embryonnaire, leurs plastes se différencient, leur volume vacuolaire diminue, les ribosomes sont nombreux ainsi que les plasmodesmes. Les longues cellules forment la région du suspenseur, où les plastes restent indifférenciés, les mitochondries se développent et les plasmodesmes sont peu nombreux.

Pendant le stade cotylédonnaire, le réticulum endoplasmique lisse est remplacé par un réticulum endoplasmique granuleux. On observe l'excretion de polysaccharides, qui forment un mucilage extra-cellulaire.

## **2.8.-LES ASPECTS BIOCHIMIQUES :**

Des différences biochimiques ont été mises en évidence entre cals embryogènes et cals non embryogènes [77].

Ces différences concernent les concentrations en glutathion, la production d'éthylène, les taux de synthèse des protéines.

Ces différences ne dépendent pas des espèces étudiées, elles permettent donc de prévoir le potentiel embryogène des cultures.

Pendant le traitement à l'ABA exogène (voir plus loin : conditions de culture pour la maturation des embryons), les cultures accumulent des éléments nutritifs : lipides, protéines et hydrates de carbone.

Cependant l'accumulation de triglycérides reste plus faible que chez les embryons zygotiques, ce qui peut être mis en relation avec les difficultés de développement et de germination des embryons somatiques de conifères [26].

On peut expliquer cette difficulté d'accumulation des triglycérides par l'absence des influences maternelles, par les conditions de culture et par la position de l'embryon sur le milieu (Joy-1991, cité par [70]).

L'accumulation des protéines a été comparée entre embryons zygotiques et embryons somatiques chez *Picea engelmannii* [27] [28] [29] :

Les protéines accumulées ont les mêmes caractéristiques physico-chimiques et le processus d'accumulation est à peu près le même, bien que pour certaines protéines, la cinétique d'accumulation au cours des derniers stades de maturation soit différente.

Roberts en 1989 [55], en utilisant la technique de SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) couplée à des observations au microscope, a mis en évidence une étroite relation entre la perte de compétence à l'embryogenèse somatique des explants et le début du processus de stockage des protéines.

## **2.9.-LES ASPECTS GENETIQUES :**

Lorsque l'explant mis en culture est le mégagamétophyte, celui-ci peut contenir plusieurs embryons zygotiques immatures ayant des génotypes différents, à cause du phénomène de polyembryonie simple, fréquent chez les conifères : plusieurs gamètes femelles ont pu être fertilisées.

Le tissu embryogène peut donc être issu de plusieurs embryons zygotiques et il en résulte des lignées cellulaires génétiquement différentes : les embryons somatiques issus d'une même graine peuvent donc être génétiquement différents. Becwar et al.(1991) a observé des différences génétiques dans la proportion de 1/12 [11].

Lorsque l'explant mis en culture est un embryon zygotique isolé, Eastman et al., en 1991 [25], ont montré que chez *Picea glauca*, groupe *engelmannii* il y a peu de variations génétiques et que cette méthode de multiplication *in-vitro* est donc appropriée à la propagation clonale, chez cette espèce de conifères.

## 2.10.-FACTEURS AYANT UNE INFLUENCE SUR L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE :

### 2.10.1.-CHOIX DES ESPECES ET DES GENRES :

Voir tableau en annexe.

Le genre ayant donné les meilleurs résultats est *Picea* ; le genre *Pinus* a été aussi beaucoup testé, parfois avec succès.

Le degré de réussite de l'embryogenèse somatique varie beaucoup selon les genres, mais également selon les espèces à l'intérieur d'un même genre. Des comparaisons entre espèces d'un même genre ont été établies : Attree a montré en 1990 [9] que l'épinette noire (*Picea mariana*) se prête mieux à la régénération de plantules par embryogenèse somatique que l'épinette blanche (*Picea glauca*).

*Picea mariana* : 73% de fréquence de germination ; 60% de survie après transfert au sol.

*Picea glauca* : 64% de fréquence de germination ; 18% de survie après transfert au sol, dont la moitié sont entrés en dormance.

Cheliak et Klimaszewska, en 1990 [19], ont comparé les capacités d'embryogenèse somatique entre 20 familles différentes de l'espèce *Picea mariana* et ont étudié l'influence des variations génétiques sur la réponse à l'embryogenèse somatique.

D'autres auteurs ont étudié les différences de réussite de l'embryogenèse somatique selon le génotype des explants [12] [37].

Laine et David, en 1990 [48], ont montré que les différents génotypes requièrent différentes conditions nutritionnelles.

### 2.10.2.-CHOIX DES EXPLANTS :

Voir tableau en annexe.

#### 2.10.2.1.-Degré de maturité de l'explant mis en culture :

Le degré de maturité de l'explant a une importance considérable.

Par exemple, Tautorus en 1990 [69] a comparé les résultats obtenus avec l'espèce *Picea mariana* selon l'explant mis en culture : pour le même milieu de culture, le taux de formation d'un cal embryogène est de 65% si l'explant est un embryon zygotique immature, de 8% si l'explant est un embryon zygotique mature.

D'autres comparaisons de ce genre [12] [37] [48] ont montré que les explants immatures ont une meilleure compétence que les explants plus âgés pour l'embryogenèse somatique. Ce qui est assez logique car, s'en trouvant moins éloignés, ils sont plus aptes à recouvrer leur totipotence originelle.

Cependant, la période la plus favorable à l'initiation de l'embryogenèse somatique varie selon les espèces :

Par exemple, avec le genre *Pinus*, ce sont les embryons zygotiques précotylédonnaires, alors que chez *Picea*, ce sont les embryons zygotiques après le développement des primordia des cotylédons [12] [70].

Becwar et al. en 1990 [12] a cherché à déterminer le stade de développement de l'explant optimal pour l'initiation de cultures embryogènes chez *Pinus taeda* : c'est l'embryon zygotique de moins de 0.5 mm de long, immédiatement avant le développement des primordia des cotylédons. Becwar suggère de déterminer le stade le plus favorable d'après la taille et la morphologie de l'embryon zygotique et non d'après son âge car le stade de développement peut être très différent pour 2 embryons du même âge.

La méthode employée par Roberts [55] pour observer le processus de stockage des protéines (cf § 2-8) peut être utilisée pour sélectionner les embryons zygotiques les plus aptes à l'embryogenèse somatique : au stade précédent l'accumulation des protéines.

Cependant de nombreux résultats positifs ont été obtenus avec des embryons zygotiques mûrs ou même des cotylédons ou de jeunes plantules (voir tableau en annexe).

L'explant le plus âgé qui ait été utilisé est une jeune plantule de 30 jours [5].

Ceci s'explique par l'amélioration des conditions de culture.

Toutefois dans le cas de l'utilisation d'embryons zygotiques matures, Tremblay a montré en 1990 [71] chez *Picea glauca* que le rendement en tissu embryogène varie selon la provenance géographique des graines, leur nombre d'années d'entreposage (établi également par Bourgard et Favre en 1988 chez *Sequoia sempervirens* [18]), leur durée d'imbibition, le pourcentage de germination du lot de graines utilisé.

Il est possible également d'utiliser comme explants des embryons somatiques matures, ils donnent naissance à un tissu embryogène de la même manière que les embryons zygotiques, avec de meilleurs résultats [53].

Dans le cas de l'embryogenèse haploïde [1] [2] [63], l'explant mis en culture est le gamétophyte femelle et le tissu embryogène provient de ce mégagamétophyte, il est haploïde.

#### 2.10.2.2.-Traitement de l'explant mis en culture :

La réfrigération des graines avant la dissection des embryons zygotiques peut améliorer l'induction de l'embryogenèse somatique (Attree et al. en 1991, cités par [70]).

Les graines peuvent avoir été stockées pendant de nombreuses années avant d'être utilisées : 10 ans dans le cas de *Picea mariana* [5], 11 ans pour *Picea glauca* [71] et 13 ans pour *Picea mariana* Mill. [69]

Cette possibilité est très intéressante dans le cas de conifères dont la production de graines est irrégulière.

Certaines études ont montré que si on laisse une partie du mégagamétophyte attachée à l'embryon zygotique mis en culture, le taux de production de tissu embryogène est amélioré :

-Klimaszewska en 1989 [42], chez une espèce hybride de mélèze : un tissu embryogène n'est produit que si l'explant mis en culture comprend la partie archégoniale du mégagamétophyte et l'embryon zygotique ; mais le tissu embryogène obtenu est diploïde, il provient de l'embryon.

-Becwar et Nagmani en 1990 chez *Pinus taeda* [12] : l'ajout d'hormones de croissance n'est pas nécessaire si on laisse le mégagamétophyte attaché à l'explant mis en culture.

-autre exemple : Gupta et Durzan en 1986 avec *Pinus lambertiana*, cité par [70].

### 2.10.3.-CONDITIONS DE CULTURE POUR L'INDUCTION DE L'EMBRYOGENESE :

#### 2.10.3.1.-Milieux de culture de base :

Différents milieux de culture ont été utilisés pour favoriser l'initiation de l'embryogenèse somatique (voir tableau en annexe).

Ils sont complétés généralement par du saccharose et par des régulateurs de croissance.

#### 2.10.3.2.-Régulateurs de croissance :

Ce sont généralement l'auxine et la cytokinine.

Différents types d'auxine ont été testés :

Jain et al. en 1988 [38] montrent que le NAA est plus efficace que le IAA ou le 2,4,5-T. Avec le genre *Pinus*, des cultures embryogènes ont été initiées avec seulement l'auxine comme régulateur de croissance, sans cytokinine (Gupta et Durzan, 1986, cités par [70]).

Lelu et al. en 1990 [50] font également remarquer que l'initiation de l'embryogenèse somatique sur des cotylédons de *Picea abies* est possible avec seulement l'auxine comme régulateur de croissance et que ce résultat est contradictoire avec celui de von Arnold en 1987 sur des embryons matures de la même espèce.

Dans certains cas, seule la cytokinine a été utilisée comme régulateur de croissance dans le milieu de base, sans auxine ; l'ajout d'auxine a même été défavorable [54] [66].

Certaines cultures embryogènes ont été obtenues sur un milieu sans régulateur de croissance (Chandler et Young, 1990, cités par [52]). Lorsque le mégagamétophyte a été cultivé avec l'embryon zygotique, l'ajout de régulateurs de croissance n'est pas indispensable [12] (voir ci-dessus : traitement de l'explant mis en culture).

Un prétraitement sur un milieu de culture riche en cytokinine (4,5  $\mu\text{M}$  de BA et 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA) est très favorable à l'initiation de l'embryogenèse somatique à partir de cotylédons chez *Picea abies*, *P. mariana* et *P. glauca* [49] [50]. Le taux d'induction passe de 2% sans prétraitement à 20% avec un prétraitement d'une semaine chez *P. abies*.

Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus par d'autres auteurs : l'effet d'un prétraitement à la cytokinine avant la mise en culture n'a pas apporté une amélioration significative dans d'autres expérimentations chez *Picea glauca* et *Picea mariana* [5], et chez *Picea abies* [52].

Mais Mo et von Arnold, 1991 [52], citent d'autres cas où le prétraitement à la cytokinine a été favorable chez *Picea abies* (Krogstrup en 1986 et Lelu en 1987).

#### 2.10.3.3.-Modifications du milieu de culture de base :

Jain et al. en 1988 [38] modifient le milieu de base LP en supprimant les acides aminés et les sucres autres que le saccharose. Ils obtiennent de très bons résultats : un taux de développement de tissu embryogène de 55%.

L'ajout d'un acide aminé supplémentaire, sous la forme de CH (hydrolysate de caséine) a été testé [69] ; l'effet sur l'initiation de l'embryogenèse somatique est défavorable.

L. Tremblay et F. Tremblay en 1991 [72] ont comparé différentes concentrations en saccharose dans le milieu chez *Picea mariana* et *Picea rubens* : 6% s'est révélée être la plus appropriée. Elles ont comparé les effets de 9 hydrates de carbone à différentes concentrations : ils se sont révélés être positifs pour le fructose, le saccharose, le glucose, le maltose et le cellobiose, et négatifs pour le mannitol, le sorbitol, le myo-inositol et l'arabinose. Elles ont observé que les résultats sont parfois différents chez les 2 espèces étudiées.

Différents types d'apport en azote ont été testés chez *Abies nordmanniana* [54]. Il n'y a pas de différences significatives lorsque la composition du milieu en azote est modifiée.

#### 2.10.3.4.-Autres conditions de culture :

La plupart des cultures sont effectuées à l'obscurité.

Verhagen et Wann, en 1989 [75], ont expérimenté des cultures sous une photopériode de 16h. Les auteurs ont montré que le succès de l'embryogenèse somatique dans ces conditions peut être dû au remplacement de l'azote sous forme inorganique ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et  $\text{KNO}_3$ ) par de l'azote sous forme organique (glutamine) dans le milieu de base.

L'effet de différentes pressions partielles en oxygène et en dioxyde de carbone a été testé [47]:

L'effet de la pression en  $\text{O}_2$  dépend de la concentration du milieu de base utilisé : les basses pressions sont stimulantes sur le milieu LP à concentration normale ; elles sont inhibitrices si le milieu est utilisé à la moitié de sa concentration.

Des pressions élevées en  $\text{CO}_2$  (6 kPa) sont préférables pour les 2 milieux.

Différents agents solidifiants ont parfois été comparés. Klimaszewska, en 1989 [42], a montré que le gelifiant de la firme Gelrite ("Gelrite gellan gum") est préférable au gelifiant bacto agar de la firme Difco.

#### 2.10.4.-CONDITIONS DE CULTURE POUR LA MATURATION DES EMBRYONS ET LE DEVELOPPEMENT EN PLANTULES :

Beaucoup d'améliorations restent à faire concernant la conversion des embryons somatiques en plantules. Les résultats obtenus sont souvent décevants (voir tableau en annexe). Le milieu employé pour le développement des embryons somatiques est dépourvu d'hormones de croissance.

##### 2.10.4.1.-Choix des embryons :

Les capacités de maturation et de développement en plantules varient selon les géotypes [39] [47].

De plus Jalonen [39] a montré que l'on peut facilement distinguer au microscope les embryons somatiques de géotypes différents (chez *Picea abies*) et qu'il existe des points communs anatomiques entre les embryons de lignées ayant une bonne capacité de maturation (ils sont mieux formés, plus symétriques).

##### 2.10.4.2.-Traitement à l'acide abscissique :

De nombreuses études ont montré qu'un traitement préalable à l'acide abscissique (ABA), avant le transfert sur le nouveau milieu sans hormone, favorise la maturation des embryons somatiques [3], [22], [35], [58].

Cet effet de l'ABA peut s'expliquer par un effet inhibiteur du processus de clivage embryonnaire (qui conduirait à la formation de plusieurs embryons dont un seul survit par la suite), ce qui conduit au développement d'embryons somatiques individuels [45].

Il s'explique aussi par l'inhibition de la germination précoce, permettant ainsi l'accumulation de protéines [58].

Différentes concentrations en ABA et durées d'exposition à l'ABA ont été testées.

La concentration et la durée d'exposition optimales sont :

-7,6 à 16  $\mu\text{M}$  dans certaines expériences : chez *Picea abies* [3], *Picea mariana* [9], *Pinus strobus* (Finer et al. en 1989, cités par [70]).

-40 à 60  $\mu\text{M}$  dans d'autres cas : chez *Picea glauca*, groupe *engelmannii* [58] [78], chez *Picea glauca* [21].

Le solvant utilisé pour dissoudre l'ABA semble avoir une importance [21]. Cependant, le solvant utilisé n'est pas toujours indiqué par les auteurs.

L'effet de certains analogues à l'ABA a été testé :

On obtient le même effet qu'avec l'ABA en utilisant l'alcool abscissique (abscissyl alcohol) : un analogue de l'ABA, métabolite naturel de l'ABA [21].

D'autres analogues à l'ABA, connus comme étant transformés *in vivo* en ABA par les plantes entières, ont été testés : l'ester epoxy (epoxy ester : EE) et l'acide epoxy (epoxy acid : EA) sont inefficaces ; l'ester méthylique de l'ABA (methyl abscissate : MeABA) est 2 fois moins efficace que l'ABA [22].

Roberts et Flinn, en 1990 [58], font remarquer que l'ajout d'IBA : acide indole-3-butyrique en faible proportion dans le milieu contenant de l'ABA favorise la maturation des embryons et améliore leur développement morphologique (les meilleurs résultats sont obtenus avec un rapport ABA/IBA de 40/10).

#### 2.10.4.3.-Dessèchement partiel à haute humidité relative :

Il a été constaté une amélioration de la germination et du taux de survivance des plantules dans le cas de *Picea glauca* [59], [62], [78] et celui de *Picea sitchensis* [56], [60] lorsque le traitement à l'ABA est suivi d'un dessèchement partiel à haute humidité relative (> 95%).

Grâce à ce traitement, l'allongement de la racine et celui de l'hypocotyle et des cotylédons sont synchrones.

Il semble que le dessèchement partiel empêche certains évènements métaboliques liés aux premiers stades de la germination de se produire.

Il y a un lien entre l'effet du traitement à haute humidité relative sur la germination et le taux en ABA : plus la concentration en ABA dans le milieu est élevée, plus le traitement à HHR doit durer longtemps pour obtenir les mêmes résultats.

#### 2.10.4.4.-Pression osmotique :

Les effets d'une augmentation de la pression osmotique en ajoutant une certaine concentration de mannitol ont été testés [57] :

Une faible dose de mannitol (2-6%) stimule les premières phases de maturation (jusqu'au stade globulaire) mais inhibe les dernières phases (formation des cotylédons). De plus fortes concentrations en mannitol (13-20%) sont nécessaires pour inhiber la germination précoce et favoriser l'accumulation des protéines, et sont moins efficaces qu'un traitement à l'ABA. Le traitement au mannitol n'augmente pas le taux de germination des embryons.

#### 2.10.4.5.-Pression en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> :

L'effet de différentes pressions en O<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> a été étudié [47], il dépend du génotype des embryons, ce qui rend les résultats difficiles à interpréter. Cependant, les meilleurs taux semblent être de 5 kPa O<sub>2</sub> et 6 kPa CO<sub>2</sub>.

#### 2.10.4.6.-Autres conditions :

Différents agents gélifiants ont été comparés pour le développement des embryons somatiques [73] : le gelifiant Gelrite est préférable au gelifiant bacto agar.

Différentes concentrations en nitrate d'ammonium ont également été testées par les mêmes auteurs : la concentration optimale est de 3,4-10 mM pour *Picea mariana* et de 3,4-15 mM pour *Picea rubens*.

Un meilleur taux de germination est obtenu si les cultures sont à l'obscurité pendant leur phase de croissance, puis éclairées pendant leur phase de maturation [73].

Le milieu de culture pour la maturation et la germination est en général un milieu solide. Cependant, des milieux liquides ont été testés, au moins pendant la phase initiale de maturation [16, [44].

Si un milieu liquide est utilisé pendant plus longtemps (6 semaines) le taux d'obtention de plantules est faible (Tautorius en 1990, cité par [70]).

Certaines études ont montré que le fait de séparer les embryons somatiques ayant atteint le stade 3 (cf § 2-4) pour les cultiver séparément et individuellement améliore leur taux de germination [3], [9], [21], [44].

#### 2.10.5.-ETABLISSEMENT AU SOL :

Concernant l'établissement au sol des plantules obtenues, il y a peu d'informations. Les résultats en nombre de plantes obtenues par rapport au nombre d'embryons cultivés sont rarement communiqués.

Quelques chiffres :

Chez *Picea abies*, 56% des embryons somatiques mûrs ont ensuite pris racines mais 29% seulement ont survécu une fois établis au sol [10]. Les plantules obtenues étaient différentes de celles obtenues à partir d'embryons zygotiques : les branches latérales étaient moins nombreuses.

Chez *Picea mariana*, 61% des plantes ont survécu après transfert au sol, mais seulement 18% chez *Picea glauca* [9].

La mort des plantules une fois établies au sol peut être due à la présence d'un gène létal (Fowler et al. en 1988, cités par [70]), ou plus fréquemment à un stress hydrique : Dunstan et al., en 1991 [21], ont obtenu un taux de survie des plantes de 52% en utilisant une chambre de culture à arrosage automatisé ("self watering unit")

Roberts et Flinn, en 1990 [58], mettent en évidence un lien entre la vigueur des plantes obtenues et le degré de maturité des embryons : plus ils contiennent de protéines de stockage, plus elles sont robustes.

Le meilleur taux d'acclimatation des plantules au sol a été obtenu par Webster et al., en 1990 [78], avec *Picea glauca* groupe *engelmannii* : plusieurs génotypes ont été testés, le taux de survie a dépassé 80% pour la plupart des génotypes. Plus de 1200 plantules ont été établies en pépinière. La morphologie, la taille, le taux de croissance et la résistance au gel de ces plantules sont les mêmes que chez celles qui proviennent d'embryons zygotiques.

Le taux de réussite du transfert au sol des plantules pourrait être amélioré par l'établissement d'une ectomycorhize. L'inoculation de diverses espèces de champignons symbiotiques a été tentée chez des plantules à 3 stades de développement différents issues d'embryogenèse somatique de l'espèce *Picea sitchensis* [65].

La mycorhize n'a réussi que chez les plantules les plus âgées: 26 semaines. Le développement de l'ectomycorhize varie selon les espèces de champignons. La mycorhize a un effet positif sur la croissance des plantules (sauf pour une espèce de champignon).

### **2.11.-CULTURES EN SUSPENSION :**

Les cultures en suspension permettent d'obtenir un plus grand nombre d'embryons, elles nécessitent moins de travail, moins de temps, elles sont plus pratiques pour étudier le métabolisme, la génétique des embryons. Les conditions de culture peuvent être plus facilement contrôlées. Elles permettent de produire des protoplastes (voir ci-dessous).

Les cultures en suspension sont composées d'embryons somatiques, de cellules isodiamétriques et de cellules allongées (Tautorius en 1990, cité par [70]).

Toutes les lignées cellulaires ne peuvent pas être mises en culture en suspension : chez *Picea mariana*, 50% d'échec [69].

La composition de l'environnement gazeux des cultures en CO<sub>2</sub> et en éthylène a été étudiée par Kumar et al. en 1989 [46].

Le taux de prolifération des cultures en suspension est influencé par la densité des cultures et par leur volume total [45].

Les cultures en suspension conservent leurs capacités de régénération après plus de 6 mois de culture [35] ou même 2 ans de culture ([53] et Boulay et al. cités par [53]).

### **2.12.-CULTURES DE PROTOPLASTES :**

Les cultures de protoplastes sont très utiles pour étudier l'infrastructure des cellules, la physiologie cellulaire et surtout pour faire des manipulations génétiques.

C'est en 1987 et 88 que des expériences de régénération d'embryons somatiques à partir de protoplastes ont été réussies.

Des suspensions cellulaires sont toujours utilisées comme matériel de départ.

Voir tableau en annexe.

En 1988, Gupta et al. [33] montrent qu'une concentration importante (6%) en myoinositol améliore les résultats chez les espèces *Pseudotsuga menziesii* et *Pinus taeda*.

Chez *Picea glauca*, Attree et al. en 1989 [6] utilisent le myoinositol en combinaison avec d'autres composés osmotiques.

De nombreuses études montrent que les résultats varient beaucoup selon le génotype des cellules [7], [43], [48], [69].

La durée nécessaire à la régénération des embryons somatiques est très variable selon les espèces utilisées.

La régénération d'embryons somatiques à partir de protoplastes semble meilleure si les protoplastes ont été isolés à partir de suspensions cellulaires à faibles capacités embryogènes ([69] et Bekkaoui et al. en 1987 cités par [69]).

Cependant des résultats différents ont été observés par Klimaszewska en 1989 [43].

Il a été observé que les embryons somatiques étaient issus de protoplastes petits et denses en cytoplasme plutôt que de protoplastes très vacuolisés [33], [43], [48].

Des plantules ont parfois été régénérées à partir de protoplastes (voir tableau).

### **2.13.-MANIPULATIONS GENETIQUES :**

La régénération d'embryons somatiques à partir de protoplastes fournit un matériel intéressant pour des expériences de transfert génétique chez les conifères.

Une des techniques utilisées est l'électroporation : les protoplastes sont exposés à un champ électrique qui crée des pores dans la membrane plasmique et permet l'échange d'ADN. Cette technique a été utilisée pour transférer le gène CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) chez *Picea glauca* et *Picea mariana* ([13], Bekkaoui et al. en 1988 cités par [70], Tautorius et al. en 1989 cités par [70]) ou le gène  $\beta$ -GUS ( $\beta$ -glucuronidase) [13]. Différents promoteurs ont été testés par Bekkaoui en 1990 [13].

Cette technique a aussi été utilisée pour introduire le gène luc (luciférase) dans des protoplastes chez *Pseudotsuga menziesii* et *Pinus taeda* [33] : la viabilité des protoplastes est réduite par l'électroporation (elle passe de 90 à 45%). L'expression du gène est améliorée si on ajoute du polyéthylène glycol (PEG) dans le milieu d'électroporation.

Une autre technique a également été utilisée : l'endocytose stimulée chimiquement par le PEG (Wilson et al. en 1989, cités par [70]).

### **2.14.-CONSERVATION DU TISSU EMBRYOGENE :**

Kartha et al. en 1988 [41] ont conservé des cultures embryogènes pendant 1 an. Peu de cellules ont survécu au traitement.

Bercetche et al. en 1990 [15] ont pu conserver par cryoconservation dans l'azote liquide à -196°C un tissu embryogène pendant 3 mois et ce tissu a ensuite produit des embryons au stade 3 plus rapidement que le tissu non cryoconservé.

De plus, les capacités de régénération en plantules ont été améliorées par la cryoconservation : le nombre d'embryons obtenus par cal est plus important, le nombre de plantules régénérées également, et les embryons présentent un plus faible taux d'arrêt de croissance du pôle caulinaire.

Joy et al. en 1991 [40] ont réussi à stocker du tissu embryogène de *Picea glauca* à température ambiante dans des flacons à sérum scellés. Après un an, 80% des cultures sont restées viables. Leurs caractéristiques de croissance sont ensuite identiques à celles des cultures dont elles sont issues.

## **2.15.-CONCLUSION**

Des progrès considérables ont été fait, surtout chez le genre *Picea*.

Restent à améliorer surtout la conversion des embryons en plantules et leur acclimatation au sol.

Les expériences de transfert génétique sur les protoplastes et la possibilité de régénérer des plantules à partir de ces protoplastes ouvrent de nombreuses voies de recherche.

# ANNEXES

**TABLEAU RECAPITULATIF DES EXPERIENCES  
D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE (OU HAPLOIDE)  
CHEZ LES GYMNOSPERMES :**

Les études effectuées avant 1988 sont également citées car elles ont été reportées dans l'article de T.E. Tautorus (70) et cela permet d'avoir une vision plus globale des recherches.

espèces	Explants	Milieux de base *(a)	% de tissu embryogène	Production de plantules	Références *(b)
<i>Pinus alba</i>	gamétophyte femelle *(c)	SH	23	non	(66)
<i>Pinus rodmanniana</i>	gamétophyte femelle *(c) ou embryons immatures	1/2 MS	30	non	(54)
<i>Pinus decidua</i>	gamétophyte femelle *(d)	1/2 LM	0,1	oui	Nagmani et Bonga (1985) et (1)
<i>Pinus</i>	idem	LM	90	? *(e)	von Aderkas et al (1987)
	id	LM	8	non	(2)
	embryons immatures	MSG	35	?	(2)
<i>Pinus decidua</i>	gamétophyte femelle *(d)	1/2 LM	3	non	(2)
<i>L. leptolepis</i>	embryons immatures	MSG	12	?	(2)
	id	DCR	15	oui et établies au sol *(f)	(42)
<i>Pinus leptolepis</i>	gamétophyte femelle *(d)	1/2 LM	3	non	(2)
	embryons immatures	MSG	28	?	(2)

<i>leptolepis</i> <i>. decidua</i>	gamétophyte femelle *(d)	1/2 LM	3	non	(2)
	embryons immatures	MSG	28	?	(2)
	id	MSG	25	oui et établies au sol *(f)	(42)
<i>ea abies</i>	gamétophyte femelle *(c)	N6	?	non	Simola et Santanen (1990)
	embryons immatures	MS	38	oui et établies au sol	Chalupa (1985)
	id	LP	50	non	Hakman et al (1985)
	id	id	95	oui	Hakman et von arnold (1985)
	id	id	78	oui	Becwar et al (1987)
	id	id	?	oui et établies au sol	(3)
	id	1/2 LP	?	oui	(36)
	id	DCR	?	oui	(15)
	embryons matures	MS	8	oui	Chalupa (1985)
	id	1/2 MS	6	oui	Gupta et Durzan (1986)
	id	LP	11	?	von Arnold et Hakman (1986)
	id	1/2 LP	50	oui	von Arnold (1987)
	id	1/2 MS	?	oui	(16)
	id	LP	55	oui	(38)
	id	1/2 LP	?	oui et établies au sol	(3)
	id	MSG	32	oui	(75)
	id	1/2 LP	45	oui	(53)
	id	LP	50	?	(47)
	id	1/2 LP	?	oui	(39)
	id	1/2 LP	34	oui	(52)
	embryons <u>somatiques</u> au stade 3	1/2 LP	81	oui	(53)

	cotyledons	1/2 MS	5	?	Krogstrup (1986)
	id	MS	20	oui	(50)
	id	DCR	?	oui	(15)
	semis de 36 jours	1/2 LP	36	oui	(52)
<i>ea glauca</i>	embryons immatures	LP	22	oui	Hakman et Fowke (1987) et (22)et (35)
	id	LP	67	oui	Lu et Thorpe (1987)
	id	LP	?	oui et établies au sol	(9) et (21)
	embryons matures	1/2 LM	51	oui et établies au sol	(71)
	cotyledons	LP	38	?	(5)
	id	MS	6	oui	(49)
<i>ea glauca, rupe melmannii</i>	embryons immatures	LP	60	?	(55)
	id	LP	60	oui	Webb et al (1989)
	id	LP	?	oui et établies au sol	(58), (62) et (78)
	id	LP	?		(57)
	embryons <u>somatiques</u> au stade 3	LP	30	?	(25)
<i>ea mariana</i>	embryons immatures	LP	5	oui	Hakman et Fowke (1987)
	id	LP	65	?	(69)
	id	1/2 LM	?	?	(72)
	id	1/2 LM	48	oui	(73)
	embryons matures	1/2 LM	10	?	(69)
	id	1/2 LM	?	oui et établies au sol	(9)
	cotyledons	LP	18	oui	(5)
	id	MS	26	oui	(49)
<i>ea rubens</i>	embryons matures	1/2 LM	?	?	(72)
	id	1/2 LM	29	oui	(73)

<i>Pea sitchensis</i>	embryons immatures	MS	5	oui et établies au sol	(44)
	id	LP	?	id	(60)
	embryons matures	LP	50	?	(4)
	id	MS	?	oui et établies au sol	(45)
<i>Pea wilsonii</i>	embryons immatures	LP	?	oui	Ying-hong et Zhong- shen (1990)
<i>Pea caribaea</i>	gamétophyte femelle *(c)	1/2 LP	2	oui	(48)
<i>Pea elliotii</i>	embryons immatures	WPMG	6	non	(37)
<i>Pea nbertiana</i>	embryons immatures	DCR	?	oui ? *(g)	Gupta et Durzan (1986)
	embryons matures	DCR	5	oui ? *(g)	id
<i>Pea serotina</i>	gamétophyte femelle *(c)	MSG	12	?	Becwar et al (1988)
<i>Pea strobilus</i>	gamétophyte femelle *(c)	DCR	54	non	Finer et al (1988)
	embryons immatures	DCR	3	non	id
<i>Pea taeda</i>	gamétophyte femelle *(c)	1/2 MS	10	oui et établies au sol	Gupta et Durzan (1987)
	id	MSG	3	non	(12)
	embryons immatures	DCR	5	non	id
<i>Pea dotsuga nziezii</i>	embryons immatures	1/2 MS	25	oui et établies au sol ? *(g)	Durzan et Gupta (1987)
	embryons matures	1/2 MS	0,1	id	id

<i>Quercus petraea</i>	embryons matures	MS	80	oui ? *(g)	(17)
	hypocotyles	id	13	id	id
	cotylédons	id	28	id	id
	embryons matures	id	48	non	(18)
	cotyledons et hypocotyles	id	28	non	id
	radicules	id	0	non	id
	feuilles de vitroplants	id	0	non	id

) : Milieux de base utilisés pour l'induction de l'embryogénèse somatique. Ces milieux étant parfois légèrement modifiés, se reporter aux références pour connaître les concentrations précises.

DCR : Douglas-fir cotyledon revised medium (Gupta et Durzan-1985, cités par Tautorus).

LM : Milieu de Litvay (Litvay et al.-1981, cités par Tautorus).

LP : Milieu de von Arnold et Eriksson-1981 (cités par Tautorus).

MS : Milieu de Murashige et Skoog-1962 (cités par Tautorus).

MSG : Milieu MS modifié (Becwar et al.-1988, cités par Tautorus).

N 6 : Chu et al.-1975 (cités par Tautorus).

SH : Milieu de Schenk et Hildebrandt-1972 (cités par Tautorus).

WPMG : Milieu de Lloyd et McCown-1981 (cités par Tautorus).

) : Les références indiquées en toutes lettres ne sont pas citées dans ma bibliographie mais sont dans celle de Tautorus (70).

) : Gamétophyte femelle contenant l'embryon zygotique (embryogénèse diploïde).

) : Embryogénèse haploïde.

) : Les “?” signifient que le renseignement n'est pas indiqué dans l'article en question.

) : Les auteurs n'indiquent pas quel croisement réciproque de *L. leptolepis* x *L. decidua* a été utilisé pour la production de plantules.

) : Les auteurs n'indiquent pas lequel des explants utilisés a abouti à la production de plantules.

### CULTURES DE PROTOPLASTES :

AUTEURS :	ESPECES :	RESULTATS :
Attree et al. (1987)	<i>Picea glauca</i>	Embryons somatiques régénérés
Bekkaoui, et al. (1987)	<i>Picea glauca</i>	Formation d'un cal
Gupta et Durzan (1987)	<i>Pinus taeda</i>	Embryons somatiques régénérés
Gupta et al. (1988) ref (33)	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Embryons somatiques régénérés
Lang et Kohlenbach (1989)	<i>Abies alba</i>	Structures "embryon-like" régénérées
Attree et al. (1989) ref (6)	<i>Picea glauca</i>	Production de plantules
Klimaszewska (1989) ref (43)	<i>Larix x eurolepis</i>	Production de plantules
Laine et David (1990) ref (48)	<i>Pinus caribaea</i>	Embryons au stade 3 régénérés
Tautorius et al. (1990) ref (69)	<i>Picea mariana</i>	Embryons somatiques régénérés

## BIBLIOGRAPHIE

Le nom des bases de données dans lesquelles chaque référence a été citée est également indiqué, car ce renseignement est utile pour comparer les différentes bases (PA=Pascal ; BIO=Biosis ; CHEM=Chemical Abstract).

Les références précédées d'un astérisque n'ont pas été consultées directement car elles n'ont pas été commandées et je n'ai pas reçu le TAP.

- 01-ADERKAS, P. (VON) ; BONGA, J. M.  
Formation of haploid embryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis.  
*American journal of botany*, 1988, Vol 75, N° 5, p 690-700  
PA BIO CAB
- 02-ADERKAS, P. (VON) ; KLIMASZEWSKA, K. ; BONGA, J. M.  
Diploid and haploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua*, and their reciprocal hybrids.  
*Canadian journal of forest research*, 1990, Vol 20, N° 1, p 9-14  
PA BIO CAB
- 03-ARNOLD, S. (VON) ; HAKMAN, I.  
Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA).  
*Journal of plant physiology*, 1988, Vol 132, N°2, p 164-169  
PA BIO CHEM
- 04-ARNOLD, S. (VON) ; WOODWARD, S.  
Oganogenesis and embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea sitchensis*.  
*Tree physiology*, 1988, Vol 4, N° 3, p 291-300  
PA BIO
- 05-ATTREE, S. M. ; BUDIMIR, S. ; FOWKE, L. C.  
Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce (*Picea-mariana* and *Picea-glauca*).  
*Canadian journal of botany*, 1990, Vol 68, N° 1, p 30-4  
BIO CHEM
- 06-ATTREE, S. M. ; DUNSTAN, D. I. ; FOWKE, L. C.  
Plantlet regeneration from embryogenic protoplasts of white spruce (*Picea glauca*).  
*Bio/technology*, 1989, Vol 7, N° 10, p 1060-1062  
CAB
- \* 07-ATTREE, S. M. ; DUNSTAN, D. I. ; FOWKE, L. C.  
Initiation of embryogenic callus and suspension cultures and improved embryo regeneration from protoplasts of white spruce *Picea-glauca*.  
*Canadian Journal of Botany*, 1989, Vol 67, N° 6, p 1790-1795.  
BIO

- \* 08-ATTREE, S. M. ; MOORE, D. ; SAWHNEY, V. K. ; FOWKE, L. C.  
Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce  
*Picea-glauca* moench voss somatic embryos effects of a  
nonplasmolysing water stress and abscisic acid.  
*Annals of Botany (London)*, 1991, Vol 68, N° 6, p 519-526.  
BIO
- 09-ATTREE, S. M. ; TAUTORUS, T. E. ; DUNSTAN, D. I. ;  
FOWKE, L. C.  
Somatic embryo maturation, germination and soil establishment  
of plants of black and white spruce (*Picea-mariana* and *Picea-  
glauca*).  
*Canadian Journal of Botany*, 1990, Vol 68, N° 12, p 2583-2589.  
BIO
- \* 10-BECWAR, M. R. ; NOLAND, T. L. ; WYCKOFF, J. L.  
Maturation, germination and conversion of norway spruce (*Picea  
abies* L.) somatic embryos to plants.  
*In vitro cellular & developmental biology*, 1989, Vol 25, N° 6,  
p 575-580  
PA BIO
- 11-BECWAR, M. R.; BLUSH, T. D.; BROWN, D. W.; CHESICK, E. E.  
Multiple paternal genotypes in embryonic tissue derived from  
individual immature loblolly pine seeds.  
*Plant cell, tissue and organ culture*, 1991; Vol 26, N° 1,  
p 37-44  
CAB
- 12-BECWAR, M. R. ; NAGMANI, R. ; WANN, S. R.  
Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo  
development in loblolly pine (*Pinus taeda*).  
*Canadian journal of forest research*, 1990, Vol 20, N° 6,  
p 810-817.  
PA BIO
- 13-BEKKAOUI, F. ; DATLA, R. S. S. ; PILON, M. ;  
TAUTORUS, T. E. ; CROSBY, W. L. ; DUNSTAN, D. I.  
The effects of promoter on transient expression in conifer cell  
lines.  
*Theoretical and Applied Genetics*, 1990, Vol 79, N° 3, p 353-359  
BIO
- 14-BERCETCHE, J.  
Optimisation des conditions d'obtention de plantules a partir  
de cals embryogenes chez *Picea abies* (plantlet regeneration in  
embryogenic callus from immature embryos and cotyledons of  
*Picea abies*).  
*Annales de recherches sylvicoles*, 1988, p 96-115.  
PA

15-BERCETCHE, J. ; GALERNE, M. ; DEREUDDRE, J.  
Augmentation des capacités de régénération de cals embryogènes de *Picea abies* (L.) Karst apres congélation dans l'azote liquide (Efficient regeneration of plantlets from embryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst after freezing in liquid nitrogen).  
*Comptes rendus de l'academie des sciences. serie 3, sciences de la vie*, 1990, Vol 310, N° 8, p 357-363.  
PA BIO

\* 16-BOULAY, M. P. ; GUPTA, P. K. ; KROGSTRUP, P. ; DURZAN, D. J.  
Development of somatic embryos from cell suspension cultures of norway spruce (*Picea abies* karst.).  
*Plant cell reports*, 1988, Vol 7, N° 2, p 134-137.  
PA BIO

\* 17-BOURGKARD, F. ; FAVRE, J. M.  
Somatic embryos from callus of *Sequoia sempervirens*.  
*Plant cell reports*, 1988, Vol 7, N° 6, p 445-448.  
PA BIO

18-BOURGKARD, F. ; FAVRE, J. M.  
L'embryogenese somatique chez *Sequoia sempervirens* : possibilites et limites actuelles (somatic embryogenesis in *Sequoia sempervirens* : present possibilities and limits).  
*Annales de recherches sylvicoles*, 1988, p 83-95  
PA

19-CHELIK, W. M. ; KLIMASZEWSKA, K.  
Genetic variation in somatic embryogenic response in open-pollinated families of black spruce.  
*Theoretical and applied genetics*, 1991, Vol 82, N° 2, p 185-190  
BIO CAB

20-CYR, D. R. ; WEBSTER, F. B. ; ROBERTS, D. R.  
Biochemical changes during germination of interior spruce somatic embryos and seed.  
Annual meeting of the american society of plant physiologists, Indianapolis, Indiana, USA, july 29-august 2, 1990  
*Plant physiology (Bethesda)*, 1990, Vol 93 (1 suppl.) p 139  
BIO

21-DUNSTAN, D. I. ; BETHUNE, T. D. ; ABRAMS, S. R.  
Racemic abscisic acid and abscisyl alcohol promote maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos.  
*Plant science (Limerick)*, 1991, Vol 76, N° 2, p 219-228  
BIO CAB

22-DUNSTAN, D. I. ; BEKKAOUI, F. ; PILON, M. ; FOWKE, L. C. ; ABRAMS, S. R.  
Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos.  
*Plant science (Limerick)*, 1988, Vol 58, N° 1, p 77-84  
PA BIO CHEM

23-DUNSTAN, D. I. ; LAPP, M. S.

Toward the in vitro propagation of three canadian conifer species.

*Pulp & paper canada*, 1990, Vol 91, N° 12, p 173-176

PA

\* 24-DURZAN, D. J. ; GUPTA, P. K.

*Advances in biotechnological process*

New York : éditions A. Mizrahi, 1988

Vol 9, Biotechnology in agriculture

Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in conifers,  
pp 53-82

BIO (livre)

25-EASTMAN, P. A. K. ; WEBSTER, F. B. ; PITEL, J. A. ;

ROBERTS, D. R.

Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce *Picea-glauca-engelmannii* complex using culture morphology and isozyme analysis.

*Plant cell reports*, 1991, Vol 10, N° 8, p 425-430.

BIO

26-FEIRER, R. P. ; CONKEY, J. H. ; VERHAGEN, S. A.

Triglycerides in embryogenic conifer calli : a comparison with zygotic embryos.

*Plant cell reports*, 1989, Vol 8, p 207-209

CHEM

27-FLINN, B. S. ; ROBERTS, D. R. ; TAYLOR, I. E. P.

A comparison of storage proteins and their accumulation during zygotic and somatic embryogenesis of interior spruce.

Annual meeting of the american society of plant physiologists, Indianapolis, Indiana, USA, july 29-august 2, 1990

*Plant physiology (Bethesda)*, 1990, Vol 93 (1 suppl.) p 20.

BIO

28-FLINN, B. S. ; ROBERTS, D. R. ; TAYLOR, I. E. P.

Evaluation of somatic embryos of interior spruce characterization and developmental regulation of storage proteins.

*Physiologia plantarum*, 1991, Vol 82, N° 4, p 624-632

BIO

29-FLINN, B. S. ; ROBERTS, D. R. ; WEBB, D. T. ; ELLIS, D. D. ;  
SUTTON, B. C. S.

Characterization of proteins associated with somatic and zygotic embryogenesis in white spruce (*Picea-glauca moench voss*).

Annual meeting of the american society of plant physiologists, Reno, Nevada, USA, july 10-14, 1988

*Plant physiology (Bethesda)*, 1988, Vol 86 (4 suppl.), p 127

BIO

- \* 30-FOWKE, L. C. ; ATTREE, S. M. ; WANG, H. ; DUNSTAN, D. I.  
Microtubule organization and cell division in embryogenic  
protoplast cultures of white spruce (*Picea glauca*).  
*Protoplasma*, 1990, Vol 158, N° 1-2, p 86-94  
PA BIO CAB
- 31-FOWKE, L. ; HAKMAN, I.  
Somatic embryogenesis in conifers.  
*Nato Asi series. series h, cell biology*, 1988, Vol 18, p 75-80  
PA
- 32-GUPTA, P. K.  
Advances in biotechnology of conifers.  
*Current science*, 1988, Vol 57, N° 12, p 629-637  
PA
- 33-GUPTA, P. K. ; DANDEKAR, A. M. ; DURZAN, D. J.  
Somatic proembryo formation and transient expression of a  
luciferase gene in douglas fir and loblolly pine protoplasts.  
*Plant science (Limerick)*, 1988, Vol 58, N° 1, p 85-92  
PA BIO CHEM
- \* 34-GUPTA, P. K. ; PULLMAN, G. S.  
Method for reproducing coniferous plants by somatic  
embryogenesis.  
*Biotechnology advances*, (1991), Vol 9, N° 1, p 133.  
CAB EPAT
- 35-HAKMAN, I. ; ARNOLD, S.(VON)  
Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension  
cultures of *Picea-glauca* white spruce.  
*Physiologia plantarum*, 1988, Vol 72, N° 3, p 579-587.  
PA BIO
- 36-HAKMAN, I. ; STABEL, P. ; ENGSTROM, P. ; ERIKSSON, T.  
Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo  
development in *Picea abies* Norway spruce .  
*Physiologia plantarum*, 1990, Vol 80, N° 3, p 441-445  
BIO CAB CHEM
- 37-JAIN, S. M. ; DONG, N. ; NEWTON, R. J.  
Somatic embryogenesis in slash pine *Pinus-elliottii* from  
immature embryos cultured in-vitro.  
*Plant science (Shannon)*, 1989, Vol 65, N° 2, p 233-242  
PA BIO
- 38-JAIN, S. M. ; NEWTON, R. J. ; SOLTES, E. J.  
Enhancement of somatic embryogenesis in norway spruce *Picea-*  
*abies* (1).  
*Theoretical and applied genetics*, 1988, Vol 76, N° 4, p 501-506.  
BIO
- 39-JALONEN, P. ; ARNOLD, S.(VON)  
Characterization of embryogenic cell lines of *Picea-abies* in  
relation to their competence for maturation.  
*Plant Cell Reports*, 1991, Vol 10, N° 8, p 384-387  
BIO

40-JOY, R. W. IV ; KUMAR, P. P. ; THORPE, T. A.  
Long-term storage of somatic embryogenic white spruce tissue at ambient temperature.  
*Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1991, Vol 25, N° 1,  
p 53-60.  
BIO

\* 41-KARTHA, K. K. ; FOWKE, L. C. ; LEUNG, N. L. ;  
CASWELL, K. L. ; HAKMAN, I.  
Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*).  
*Journal of plant physiology*, 1988, Vol 132, N° 5, p 529-539  
PA BIO CHEM

42-KLIMASZEWSKA, K.  
Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis.  
*Plant science (Shannon)*, 1989, Vol 63, N° 1, p 95-104  
PA BIO CAB CHEM

43-KLIMASZEWSKA, K.  
Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix x Eurolepis*.  
*Plant cell reports*, 1989, Vol 8, N° 8, p 440-444  
PA BIO CAB

44-KROGSTRUP, P. ; ERIKSEN, E. N. ; MOLLER, J. D. ; ROULUND, H.  
Somatic embryogenesis in sitka spruce (*Picea-sitchensis* (bong.) carr.)  
*Plant cell reports*, 1988, Vol 7, N° 7, p 594-597.  
PA BIO

45-KROGSTRUP, P.  
Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea-sitchensis*.  
*Plant science (Limerick)*, 1990, Vol 72, N° 1, p 115-124  
BIO

\* 46-KUMAR, P. P. ; JOY, R. W. IV ; THORPE, T. A.  
Ethylene and carbon dioxide accumulation and growth of cell suspension cultures of *Picea-glauca* white spruce.  
*Journal of plant physiology*, 1989 (1990), Vol 135, N° 5,  
p 592-596.  
PA BIO CHEM

47-KVAALEN, H. ; ARNOLD, S. (VON)  
Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea-abies*.  
*Plant cell, tissue and organ culture*, 1991, Vol 27, N° 1,  
p 49-58.  
BIO

48-LAINE, E. ; DAVID, A.

Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus-caribaea*.

*Plant science (Limerick)*, 1990, Vol 69, N° 2, p 215-224.

PA BIO CAB

49-LELU, M. A. P. ; BORNMAN, C. H.

Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea-glauca* and *Picea-mariana*.

*Plant physiology and biochemistry (Paris)*, 1990, Vol 28, N° 6, p 785-792.

PA BIO CAB CHEM

50-LELU, M. A. P. ; BOULAY, M. P. ; BORNMAN, C. H.

Somatic embryogenesis in cotyledons of *Picea-abies* is enhanced by an adventitious bud-inducing treatment.

*New forest*, 1990, Vol 4, N° 2, p 125-136.

PA BIO

\* 51-LI, Y. H. ; GUO, Z. S.

Somatic embryogenesis and plantlet formation of *Picea-Wilsonii* mast. in different conditions.

*Acta Bot Sin*, 1990, Vol 32, N° 7, p 568-570

PA BIO CAB (en chinois)

52-MO, L. H. ; ARNOLD, S. (VON)

Origin and development of embryogenic cultures from seedlings of norway spruce *Picea-abies*.

*Journal of plant physiology*, 1991, Vol 138, N° 2, p 223-230

BIO

53-MO, L. H. ; ARNOLD, S. (VON) ; LAGERCRANTZ, U.

Morphogenic and genetic stability in longterm embryogenic cultures and somatic embryos of norway spruce (*Picea abies* (l.) karst).

*Plant cell reports*, 1989, Vol 8, N° 7, p 375-378

PA BIO

54-NORGAARD, J. V. ; KROGSTRUP, P.

Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies-nordmanniana* Lk.

*Plant cell reports*, 1991, Vol 9, N° 9, p 509-513.

BIO

55-ROBERTS, D. R. ; FLINN, B. S. ; WEBB, D. T. ;

WEBSTER, F. B. ; SUTTON, B. C. S.

Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS-PAGE and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis.

*Plant cell reports*, 1989, Vol 8, N° 5, p 285-288.

PA BIO

- 56-ROBERTS, D. R. ; LAZAROFF, W. R. ; CYR, D. R. ; WEBSTER, F. B.  
Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on gene expression and germination of spruce somatic embryos.  
Annual meeting of the american society of plant physiologists, Albuquerque, New Mexico, USA, july 28-august 1, 1991  
*Plant physioly (Bethesda)*, 1991, Vol 96 (1 suppl.) p 149.  
BIO
- 57-ROBERTS, D. R.  
Abscisic acid and mannitol promote early development maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce.  
*Physiologia plantarum*, 1991, Vol 83, N° 2, p 247-254  
BIO
- 58-ROBERTS, D. R.; FLINN, B. S.; WEBB, D. T.; WEBSTER, F. B.; SUTTON, B. C. S.  
Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce.  
*Physiologia plantarum*, 1990, Vol 78, N° 3, p 355-360  
PA BIO CAB
- 59-ROBERTS, D. R. ; FLINN, B. S. ; SUTTON, B. C. S.  
Desiccation promotes and synchronizes the germination of white spruce somatic embryos .  
Annual meeting of the American Society of Plant Physiologists held jointly with the Canadian Society of Plant Physiologists, Toronto, Ontario, Canada, july 30-august 3, 1989.  
*Plant physioly (bethesda)*, 1989, Vol 89 (4 suppl.) p 8.  
BIO
- 60-ROBERTS, D. R. ; LAZAROFF, W. R. ; WEBSTER, F. B.  
Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of sitka spruce somatic embryos.  
*Journal of Plant Physiology*, 1991, Vol 138, N° 1, p 1-6  
BIO
- 61-ROBERTS, D. R. ; FLINN, B. S. ; WEBB, D. T. ; WEBSTER, F. W. SUTTON, B. C. S.  
The role of abscisic acid and IBA in the differentiation and quality of somatic embryos of white spruce.  
Annual meeting of the American Society of Plant Physiologists held jointly with the Canadian Society of Plant Physiologists, Toronto, Ontario, Canada, july 30-august 3, 1989.  
*Plant physiology (Bethesda)*, 1989, Vol 89 (4 suppl.) p 9.  
BIO
- 62-ROBERTS, D. R. ; SUTTON, B. C. S. ; FLINN, B. S.  
Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity.  
*Canadian journal of botany*, 1990, Vol 68, N° 5, p 1086-1090  
PA BIO

63-ROHR, R. ; VON ADERKAS, P. ; BONGA, J. M.  
Ultrastructural changes in haploid embryoids of *Larix decidua*  
during early embryogenesis.  
*American journal of botany*, 1989, Vol 76, N° 10, p 1460-1467  
PA CAB

64-SANTANEN, A. ; SIMOLA, L. K.  
The effect of micronutrients and growth regulators on growth  
and somatic embryogenesis in callus cultures of *Picea-abies*.  
15th congress of the Scandinavian Society for Plant Physiology,  
Turku, Finland, july 31-august 5, 1988.  
*Physiologia plantarum*, 1988, Vol 73, N° 2, p 12a.  
BIO

65-SASA, M. ; KROGSTRUP, P.  
Ectomycorrhizal formation in plantlets derived from somatic  
embryos of sitka spruce.  
*Scandinavian Journal of Forest Research*, 1991, Vol 6, N° 1,  
p 129-136.  
BIO

66-SCHULLER, A. ; REUTHER, G. ; GEIER, T.  
Somatic embryogenesis from seed explants of *Abies-alba*.  
*Plant cell, tissue and organ culture*, 1989, Vol 17, N° 1,  
p 53-58.  
PA BIO

\* 67-SIMOLA, L. K.  
Micropropagation in forest trees.  
*Luonnon Tutkija*, 1991, Vol 95, N° 1-2, p 138-142.  
BIO (en finlandais)

\* 68-SUESS, R. ; EWALD, D. ; MATSCHKE, J.  
Production of somatic embryos from seeds of the common spruce  
*Picea abies* L. Karst.  
*Beitr Forstwirtschaft*, 1990, Vol 24, N° 3, p 126-130.  
BIO (en allemand)

69-TAUTORUS, T. E. ; ATTREE, S. M. ; FOWKE, L. C. ;  
DUNSTAN, D. I.  
Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos  
and embryo regeneration from protoplasts in black spruce  
*Picea-mariana* mill.  
*Plant science (Shannon)*, 1990, Vol 67, N° 1, p 115-124.  
BIO CAB

70-TAUTORUS, T. E. ; FOWKE, L. C. ; DUNSTAN, D. I.  
Somatic embryogenesis in conifers.  
*Canadian journal of botany*, 1991, Vol 69, N° 9, p 1873-1899.  
BIO

71-TREMBLAY, F. M.  
Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos  
isolated from stored seeds of *Picea-glauca*.  
*Canadian journal of botany*, 1990, Vol 68, N° 2, p 236-242.  
BIO CAB CHEM

72-TREMBLAY, L. ; TREMBLAY, F. M.

Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea-mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*Picea-rubens* Sarg.) somatic embryos.

*Plant cell, tissue and organ culture*, 1991, Vol 27, N° 1, p 95-104.

BIO

73-TREMBLAY, L. ; TREMBLAY, F. M.

Effects of gelling agents, ammonium nitrate and light on the development of *Picea Mariana* (Mill) B. S. P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos.

*Plant science*, 1991, Vol 77, p 233-242.

BIO CHEM

\* 74-VELHO, C. C. ; SARANGA, Y. ; JANICK, J.

Density separation of zygotic and somatic embryos.

*Hortscience*, 1990, Vol 25, N° 9, p 1120

BIO

75-VERHAGEN, S. A. ; WANN, S. R.

Norway spruce somatic embryogenesis : high-frequency initiation from light-cultured mature embryos.

*Plant cell tissue and organ culture*, 1989, Vol 16, N° 2, p 103-112.

PA BIO

76-WANN, S. R.

Somatic embryogenesis in woody species.

*Horticulture revue*, 1988, Vol 10, p 153-181

PA

\* 77-WANN, S. R. ; BECWAR, M. R. ; NAGMANI, R. ; FEIRER, R. P. ; JOHNSON, M. A.

Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic calli of conifers.

*Trees (Berlin, west)*, 1989, Vol 3, N° 3, p 173-178

PA BIO

78-WEBSTER, F. B. ; ROBERTS, D. R. ; MCINNIS, S. M. ; SUTTON, B. C. S.

Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis.

*Canadian journal of forest research*, 1990, Vol 20, N° 11, p 1759-1765.

PA BIO CAB

79-ZRID J P

*Cultures de cellules, tissus et organes végétaux (fondements théoriques et utilisations pratiques).*

Lausanne : Presses Polytechniques Romandes, 1988



BIBLIOTHEQUE DE L'ENSSIB



9656565