

**Facteurs affectant le rendement, la viabilité et le comportement  
en culture des protoplastes de mélèze d'Europe : *Larix decidua* Mill.**

Khelifi L. (\*) et Favre J. M. (\*\*)

(\*) Institut National Agronomique, El Harrach – Algérie.

(\*\*) Université de Nancy Laboratoire de biologie des ligneux B.P. 239,  
54506 , Vandoeuvre – France

*Khelifi L., Favre J.M., 1995 – Facteurs affectant le rendement, la viabilité et le comportement en culture des protoplastes de mélèze d'Europe : Larix decidua Mill. Ann. Agron. I.N.A., Vol. 16, N° 1 et 2, pp. 160 – 175*

**Résumé :** Cotylédons, hypocotyles, aiguilles calcs et suspensions cellulaires qui en dérivent ont été utilisés pour préparer des protoplastes de mélèze d'Europe *Larix decidua* Mill. Les meilleurs résultats ont été obtenus à partir de protoplastes de calcs (âgés de 3 à 5 semaines), issus de cotylédons prélevés sur de jeunes germinations produites in vitro. Le milieu de culture utilisé pour la culture de protoplastes est le WPM ( Woody plant medium ) modifié. La modification de ce milieu porte essentiellement sur l'addition de glutamine ( 40 mM ) et l'utilisation de mannitol et de glucose à concentrations égales ( 0.38 M ) au lieu du saccharose seul. Dans ces conditions, plus de 90% des protoplastes régénèrent leur parois après environ 10 jours, et 13.5% entrent en activité mitotique dont la majorité évolue en microcalcs.

**Mots clés :** Protoplastes, Mélèze, Larix, glutamine, source de carbone.

**Factors affecting crop production, variability, and behaviour  
cultured *Larix decidua* Mill protoplasts**

**Abstract :** Coyledons, hypocotyls, needles and their derived cell and cell suspension were used to prepare *Larix decidua* Mill protoplasts. The best results were obtained with protoplasts prepared from cotyledon calli of 3–5 weeks cultured on a modified woody plant medium ( WPM ) complemented with glutamine (40 mM) and a combination in equal molarity ( 0.38 M ) of glucose and mannitol. On this medium, cell wall regeneration occurred after 10 days, frequency of deviding cells reached 13.5% and numerous cell clusters were obtained.

**Key-words :** Protoplasts, larch, Larix, Glutamine, Carbon supply.

## INTRODUCTION

En dépit de quelques travaux récents, la régénération de plantes complètes à partir de protoplastes demeure encore difficile chez les arbres forestiers et plus spécialement chez les conifères. L'obtention, à partir de protoplastes, de lignées cellulaires présentant une activité mitotique a été cependant signalée chez un certain nombre d'espèces : *Pseudotsuga menziesii* (KIRBY, 1981) ; *Pinus pinaster* (DAVID et al., 1984) *Pinus coulteri* (PATEL et al., 1984) *Pinus taeda* (GUPTA et DURZAN, 1987a) et *Picea glauca* (BEKKAOUI et al., 1987). L'ensemble du processus, c'est à dire, de l'isolement des protoplastes jusqu'à leur régénération en plante entière ne touche à présent que peu d'espèces : *Picea glauca* (ATTREE et al., 1987) ; *Larix eurolepis* (KLIMASZEWSKA, 1988) *Pseudotsuga menziessi* et *Pinus taeda* (GUPTA et al., 1988). Dans ces derniers cas les cultures embryogènes constituent un matériel de premier choix pour l'obtention de protoplastes à forte réactivité (GUPTA et DURZAN, 1987b).

Les cultures embryogènes sont généralement initiées à partir d'embryons zygotiques matures ou immatures (HAKMAN et VON ARNOLD, 1985 ; GUPTA et DURZAN, 1986 ; VON ARNOLD et HAKMAN, 1986; HAKMAN et FOWKE, 1987). Cependant l'obtention de ce type de cultures est également possible à partir de cotylédons et/ou d'hypocotyles prélevés sur de jeunes germinations produites in vitro comme chez *Picea abies* (KROGSTRUP, 1986 ; LELU et al., 1987), et chez *Sequoia sempervirens* (BOURGKARD et FAVRE, 1988). Ces résultats indiquent que ce dernier type d'explants présente aussi un fort potentiel morphogénique et peut donc être utilisé pour obtenir une régénération de plantes via les protoplastes.

Le but de ce travail, est de mettre au point une méthodologie de base pour initier avec succès des cultures de protoplastes préparés à partir de différents types de d'explants prélevés sur de jeunes germinations de mélèze d'Europe produites in vitro (cotylédons, hypocotyles, aiguilles ainsi que les cals et suspensions cellulaires qui en dérivent).

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Préparation du matériel végétal

Les graines utilisées lors de l'expérimentation ont été récoltées en octobre 1987 sur des mélèze d'Europe de l'arboretum de l'INRA de Champenoux (Nancy-France) et stockées ensuite à 4°C dans une chambre froide. A chaque utilisation, les graines sont désinfectées pendant 24 heures dans de l'eau oxygénée pure diluée à 2.5%, rincées abondamment à l'eau distillée stérile puis mises à germer dans les conditions suivantes : température 24°C + 1°C, photopériode: 16 heures/24 et intensité de lumière : 40 mE/m<sup>2</sup>/s produite par des lampes fluorescentes de type Sylvania Grolux.

Quatre types d'explants sont ensuite utilisés :

1- Cotylédons et hypocotyles prélevés sur de jeunes germinations âgées de 15 à 20 jours.

2- Aiguilles prélevées sur de jeunes plantules ( âgées de 20 à 25 jours ) issues d'un clonage in vitro.

3- Cals âgés de 3 à 5 semaines produits dans l'obscurité sur des cotylédons hypocotyles et des aiguilles.

4- Suspensions cellulaires obtenues, dans l'obscurité et en milieu liquide agité (150 rpm), à partir de cals cotylédonaires.

## 2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour préparer le matériel végétal sont les suivants:

- Milieu de germination: Macro-éléments de KNOP (1865) dilués au demi + FeEDTA de MS ( MURASHIGE et SKOOG, 1962 ) + 2 g/l de charbon actif + 15 g/l de saccharose + 7g/l d'agar ( Merck ) , pH = 5.6.

- Milieu de clonage : Macro + micro-éléments de MS + 30 g/l de saccharose + 2g/l de gelrite + BAP ( en pulse à 0.13 M pendant 30 minutes ) , pH = 5.6.

- Milieu de callogenèse: Macro + micro-éléments de MS + vitamines de MOREL ( in GUATHERET, 1959 ) + 30 g/l de saccharose + 9.04 mM de 2,4-D + 4.44 mM de BAP + 7 g/l d' agar (Merck) , pH = 5.6.

- Milieu de suspension cellulaire: Macro + micro-éléments MS + vitamines de MOREL (in GUATHERET , 1959) + 30 g/l de saccharose + 9.04 mM de 2,4-D + 4.44 mM de BAP , pH = 5.6.

## 3. Isolement des protoplastes

La technique de base adoptée pour l'isolement des protoplastes de mélèze a été adaptée à partir de celle de SLAOUI ( 1986 ) prévue pour l'isolement de protoplastes de chêne pédonculé. Un gramme de matériel végétal frais et stérile est placé dans 10 ml de solution de digestion enzymatique composée de : macro + micro-éléments + vitamines de WPM ( RUSSEL et McCOWN, 1986 ) + FeEDTA de MS + 48.8 mM de BAP + 0.9 M de mannitol + 5% de Cellulase ( ONOZUKA R10 Yakult, Japon ) + 1% de Macérozyme (ONOZUKA R10 Yakult, Co, Ltd, Japon ). Le pH de la solution est ajusté à 5.6. La solution de macération ( digestion enzymatique) est d'abord centrifugée pendant 10 mn à 3800 x g afin d'éliminer les impuretés, puis stérilisée par microfiltration sur filtres de marque Sartorius de porosité ( 0.22 mm).

Après 12 heures d'incubation dans l'obscurité et sous agitation (120 rpm), à une température de 27 °C, les tissus ainsi digérés sont filtrés (stérilement sous hotte à

flux laminaire) sur une toile à bluter en Nylon de maille 0.75 mm afin d'éliminer les gros débris. La mixture ainsi recueillie est centrifugée pendant 5 minutes à 150 x g. Le surnageant contenant les enzymes est éliminé et le culot contenant les protoplastes est remis en suspension dans la même solution mais dépourvue d'enzymes. L'opération est répétée 3 fois dans afin de rincer les protoplastes et d'éliminer toute trace d'enzymes. La purification finale des protoplastes est obtenue par centrifugation à 1600 x g pendant 5 minutes sur un gradient monocouche de saccharose de concentration 1,4 M. Les débris forment un culot au fond du tube, tandis que les protoplastes purifiés forment une mince couche à l'interphase entre la solution de saccharose et la solution de lavage contenant les protoplastes. Les protoplastes ainsi purifiés sont collectés à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puis remis en suspension selon une densité (= nombre de protoplastes par ml de milieu) préalablement définie.

#### **4. Culture des protoplastes**

La densité de culture est fixée à  $1 - 3 \times 10^4$  protoplastes/ml de milieu. La culture est initiée dans des boîtes de pétri (3.5 cm de diamètre) contenant le milieu de culture de base (BM) composé de: macro + micro-éléments + vitamines de WPM modifié + FeEDTA de MS + 48.8 mM de BAP + 0.2 M de mannitol + 0.2 M de glucose + 0.2 M de saccharose + 4 g/l d'agarose. Les boîtes ainsiensemencées de protoplastes sont incubées à 25 °C dans l'obscurité.

#### **5. Viabilité et régénération des parois**

La viabilité des protoplastes a été évaluée selon la méthode BORNMAN et BORNMAN (1983) par coloration à l'orange d'acridine (0.01 %). La régénération des parois a été évaluée selon la méthode de NAGATA et TAKEBE (1970) par coloration au calcofluor White St (0.01 %).

## **RESULTATS**

### **1. Sélection du matériel végétal le plus réactif**

Le rendement en protoplastes juste après digestion enzymatique varie en fonction du type du matériel végétal. Les meilleurs résultats sont obtenus sur cals dont les rendements varient entre  $22 \times 10^6$  et  $24,9 \times 10^6$  protoplastes/g de MF (= matière fraîche) respectivement pour les cals de cotylédons et les cals d'aiguilles. Leur viabilité varie entre 71 et 84%. Les hypocotyles et les suspensions cellulaires produisent le moins de protoplastes (fig. 1).

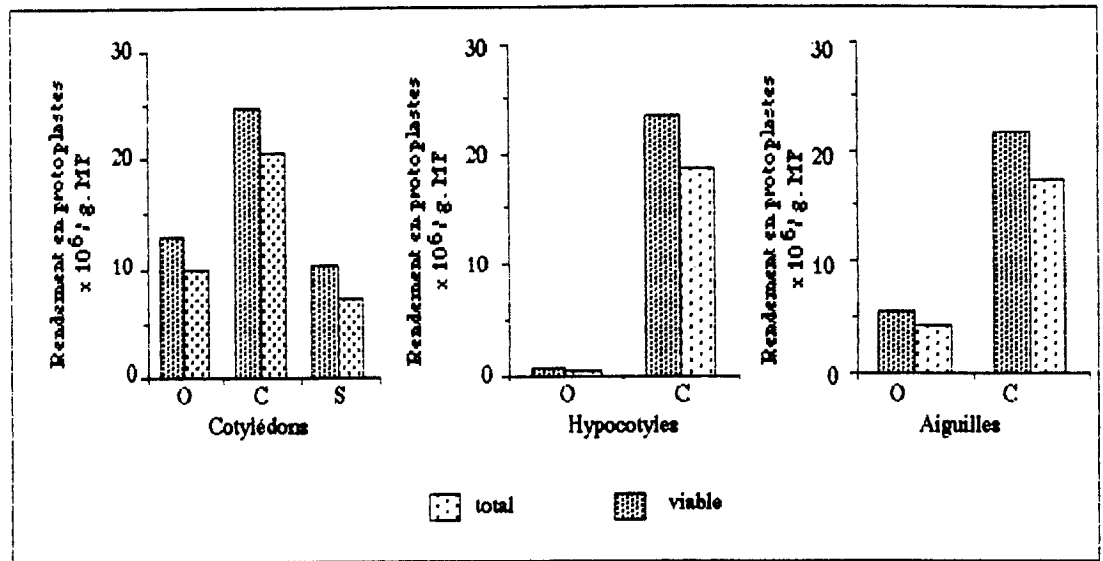


FIGURE 1: Variation des rendements en protoplastes (total et protoplastes viables) en fonction du matériel végétal utilisé (O: organes; C: cals; S: suspensions cellulaires), résultats obtenus avant purification.

Après purification, le rendement total en protoplastes pour les cals chute à  $5,1 - 6,7 \cdot 10^6$  protoplastes / g de MF. Il n'est que de  $1,8 \cdot 10^6$  et  $1,9 \cdot 10^6$  protoplastes / g de MF respectivement pour les organes et pour les suspensions cellulaires. A la purification, la viabilité est par contre de 100% quelque soit le matériel végétal considéré. Elle chute cependant après 10 jours de culture de 10 à 15 % selon le type du tissu utilisé. Il existe par ailleurs des différences importantes au niveau de la régénération des parois: 92 à 98 % des protoplastes issus de cals régénèrent leur parois en moins de 10 jours contre seulement 51 à 72 % pour les protoplastes issus de d'organes ou de suspensions cellulaires ( fig. 2 ).

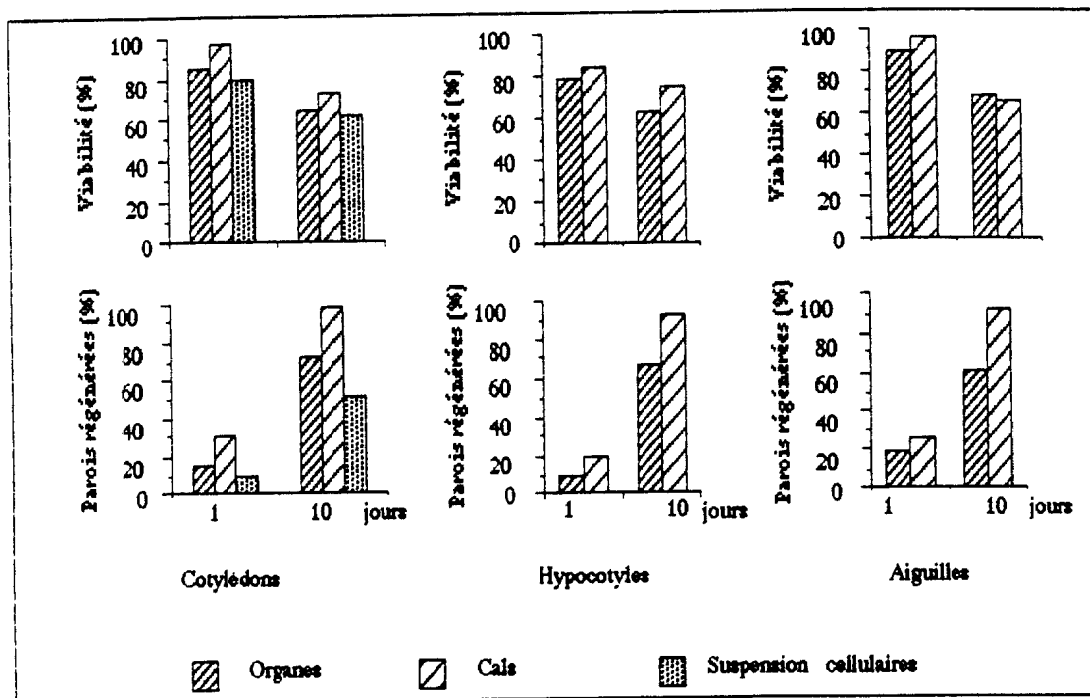


FIGURE 2: Variation des pourcentages de viabilité et régénération de parois des protoplastes après 1 et 10 jours de culture en fonction du matériel végétal utilisé.

Concernant l'entrée en activité mitotique ( fig. 7 ), les toutes premières divisions peuvent être observées durant la première semaine de culture. Les protoplastes issus de cals de cotylédons sont les plus réactifs par rapport aux protoplastes d'organes ou de suspensions cellulaires. Parmi les organes considérés, les cotylédons donnent les meilleurs résultats : environ 1 % des protoplastes évoluent en microcals de 8 cellules et plus ( fig.3 ). Les cals de cotylédons ont donc été retenus pour la suite des expériences.

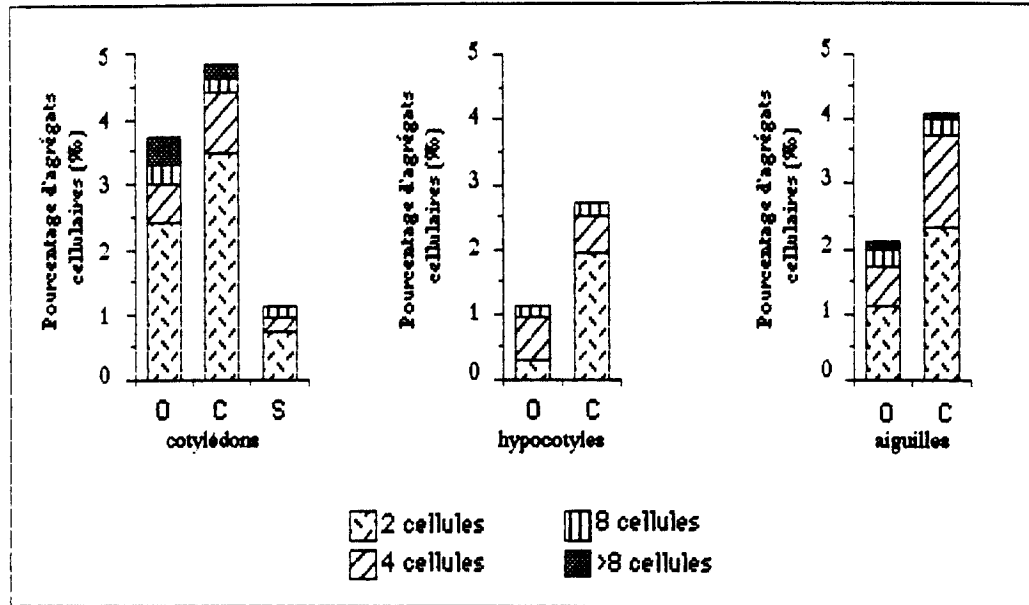


FIGURE 3: Variation de l'activité mitotique ( exprimée en % d'entrée en division, % d'agrégats cellulaires de stade 2, 4, 8 et plus de 8 cellules ) des protoplastes après 20 jours de culture sur milieu de base (BM) en fonction du matériel végétal utilisé.

## 2. Optimisation du milieu de culture

Plusieurs modifications au niveau du milieu de base (BM) ont été testées. Elles ont pour but de réajuster celui ci en vue d'une optimisation permettant un meilleur comportement des protoplastes en culture.

La première modification consiste à additionner de la glutamine à différentes concentrations ( 20, 40 ou 60 mM ) au BM.

Les résultats obtenus montrent qu'après 10 jours de culture, la viabilité est améliorée d'environ 10 à 15% quelque soit la concentration de glutamine. Les protoplastes régénèrent plus rapidement leur parois. Le pourcentage de régénération passe du simple au double après seulement un jour de culture et se stabilise à 92 -

97% après 10 jours pour l'ensemble des concentrations utilisées (fig. 4). L'amélioration du pourcentage de parois régénérées pourrait être à l'origine de l'amélioration de la viabilité. En effet, les protoplastes n'ayant pas régénéré leur paroi éclatent dans les jours qui suivent leur culture suite à l'altération de leur plasmalemme.

La glutamine induit en outre la stimulation de divisions cellulaires tout particulièrement à la concentration de 40 mM (milieu G2). Le pourcentage de divisions atteint ainsi 10‰ alors qu'il n'est que de 5‰ sur BM (fig. 4). Le milieu G2 sera donc retenu pour la suite des expériences.

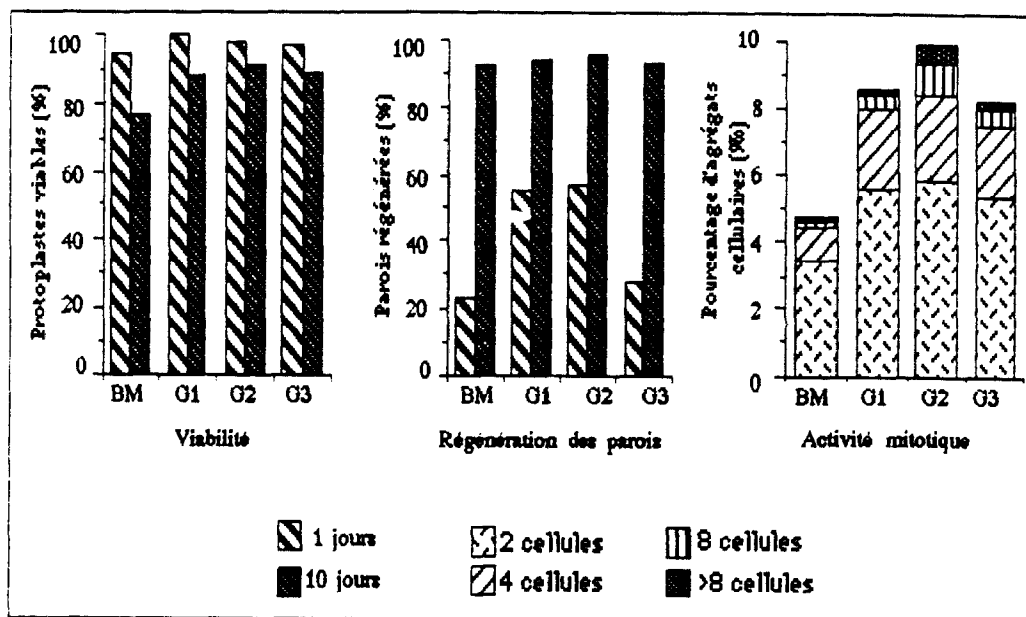


FIGURE 4: Variation de la viabilité, de la régénération des parois et de l'activité mitotique ( exprimée en % d'entrée en division, % d'agrégats cellulaires de stade 2, 4, 8 et plus de 8 cellules ) des protoplastes après 20 jours de culture sur milieux contenant des concentrations croissantes de glutamine ( G1 = 20 mM ; G2 = 40 mM ; G3 = 60 mM de glutamine).



La deuxième modification porte sur les tests d'équilibre de la balance glucidique. Ces tests consistent à substituer à la balance initiale ( saccharose + glucose + mannitol ) un seul sucre: saccharose (S), glucose (G) ou mannitol (M) chacun à une concentration de 0.77 M ( = concentration globale des 3 sucres dans le BM ).

Les résultats consignés dans la figure 5 révèlent une chute de viabilité des protoplastes en présence des milieu M, G et S. Cependant, la régénération des parois n'est pas affectée. Quant à l'activité mitotique, elle est considérablement améliorée au niveau des milieu M et G où elle passe de respectivement à 17 % et 25 % . Le saccharose par contre entraîne une nette diminution de cette activité ( fig. 5 ).

Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que le glucose est le seul ose parmi les 3 sucres utilisés, d'où sa plus grande performance au niveau de l'activité mitotique. Quant au mannitol, c'est en réalité un polyalcool ( n'est pas vraiment un sucre), mais il peut être transformé dans la cellule pour donner du glucose, du fructose ou les deux à la fois ( en équilibre). Cette propriété lui donnerait l'avantage d'être lui aussi performant au niveau des divisions cellulaires puisqu'il devient métabolisable après dégradation.

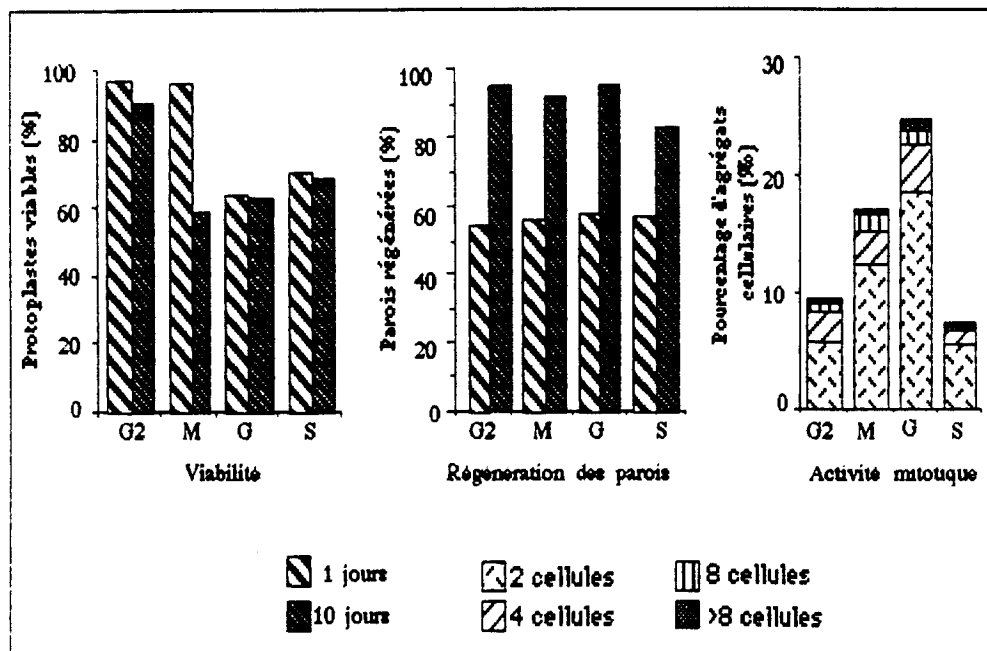


FIGURE 5: Variation de la viabilité, de la régénération des parois et de l'activité mitotique ( exprimée en % d'entrée en division, % d'agrégats cellulaires de stade 2, 4, 8 et plus de 8 cellules ) des protoplastes après 20 jours de culture sur milieu G2 contenant différentes sources de carbone ( G2 = BM + 40 mM de glutamine ; M = G2 + 0,77 M de mannitol au lieu de la combinaison glucidique de base; G = G2 + 0,77 M de glucose au lieu de la combinaison glucidique de base; S = G2 + 0,77 M de saccharose au lieu de la combinaison glucidique de base ).

Le saccharose par contre est un dissaccharide. Pour qu'il soit utilisé par la cellule, il faudrait qu'il soit d'abord réduit en oses simples ( glucose ou fructose ). Or, cette réaction nécessite un équipement enzymatique spécifique qui pourrait faire défaut aux protoplastes, ce qui expliquerait la plus faible activité mitotique qui en découle.

Les effets favorables du glucose et du mannitol sur l'activité mitotique, nous ont incité à reconsidérer une nouvelle fois la composition glucidique en combinant ces deux sucres à concentrations égales ( 0.38 M ) dans le même milieu G2. L'expérience a été suivie pendant environ 5 mois.

Les résultats ainsi obtenus ( fig. 6 ), montrent que le pourcentage d'entrée en division après 24 jours est 5 fois plus élevé que celui obtenu avec le glucose seul. Les entrées en divisions cessent après environs 40 jours pour atteindre 135 %.

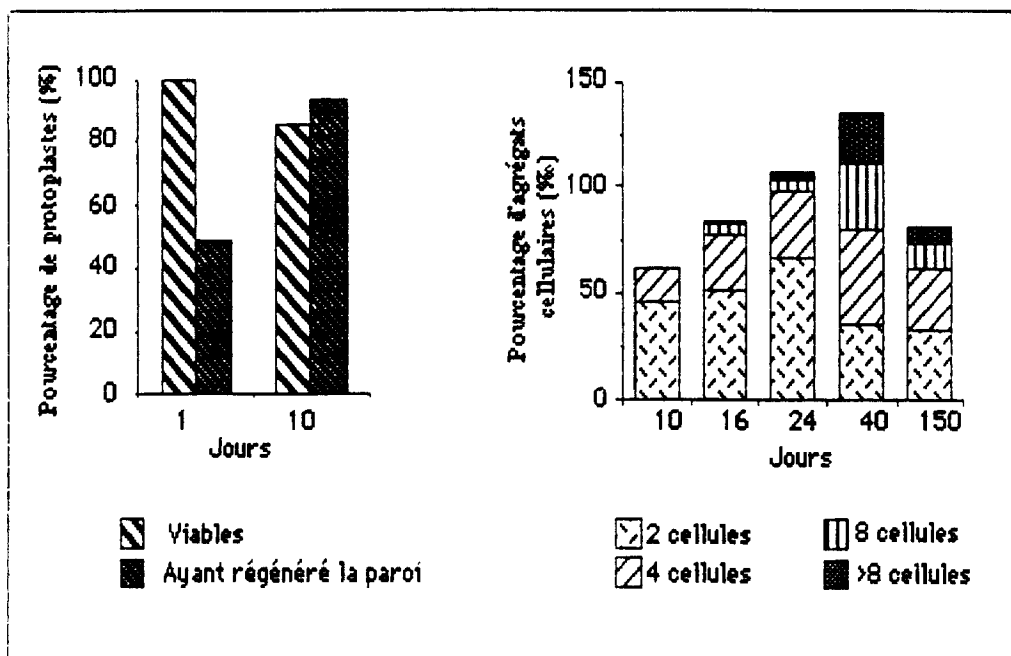


FIGURE 6: Evolution en fonction du temps, de la viabilité, de la régénération des parois et de l'activité mitotique ( exprimée en % d'entrée en division, % d'agrégats cellulaires de stade 2, 4, 8 et plus de 8 cellules ) des protoplastes en culture sur milieu G2 contenant du glucose et du mannitol à concentrations égales (0,38 M) au lieu de la combinaison initiale S + G + M .

Par ailleurs, la fréquence des cals de stade 8 cellules et plus (fig. 7) a également été améliorée. Elle passe à environ 50 %.

Finally, lorsque le BM est additionné de 40 mM de glutamine et une source de carbone composée de glucose et de mannitol à concentrations égales (0.38M), le pourcentage des entrées en divisions passe de 5 % à 135 %. Ce pourcentage se stabilise vers le 40<sup>ème</sup> jour de culture et régresse au delà. Cette régression résulte de l'arrêt des divisions et, peut être aussi, des éclatements cellulaires survenant à la suite des renouvellement de milieu.

## CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'obtenir des divisions cellulaires à partir de protoplastes issus de tissus non embryogènes de *larix decidua*. Cette espèce peut donc être additionnée à liste des espèces chez lesquelles une activité mitotique à partir de protoplastes a déjà été signalée, *Pseudotsuga menziesii* ( KIRBY et CHENG, 1979 ; KIRBY, 1980 ), *sequoia sempervirens* ( DAVID, 1987 ), *Picea glauca* (BEKKAOUI, 1987 ), et chez d'autres espèces de pins ( DAVID et DAVID, 1979 ; HAKMAN et VON ARNOLD, 1983 ; TEASDLE et RUGINI, 1983 ; PATEL et al., 1984).

Pour aboutir à ces résultats, trois facteurs, nous paraissent d'une importance capitale :

1- Le passage par le stade cal améliore considérablement les résultats par rapport à ceux obtenus directement sur organes. Ceci peut être expliqué par le fait que le cal est un tissu hautement différencié donc constitué de cellules méristématiques à forte réactivité conduisant à une activité mitotique accrue des protoplastes qui en dérivent ( SONDAHL et al., 1980 ; SITA et RANI, 1983 ; KOUIDER et al. 1984 ).

2- L'addition de glutamine ( 40 mM ) au milieu de culture stimule l'activité mitotique. Cet effet favorable a déjà été signalé par plusieurs auteurs ( KIRBY et CHENG, 1980; DAVID, 1987 ) qui ont expliqué le phénomène par une différenciation cellulaire provoquée par ce composé conduisant ainsi à une meilleure réactivité des protoplastes en culture. DAVID et al. (1984) ont par contre expliqué cela par le rôle compensatoire que joue la glutamine au niveau des cellules présentant une insuffisance pour l'assimilation de l'azote minéral in vitro.

3- La combinaison d'une sucre métabolisable tel que le glucose (RANGIL et GORDON, 1986) et d'un agent osmotique comme le mannitol constitue une balance

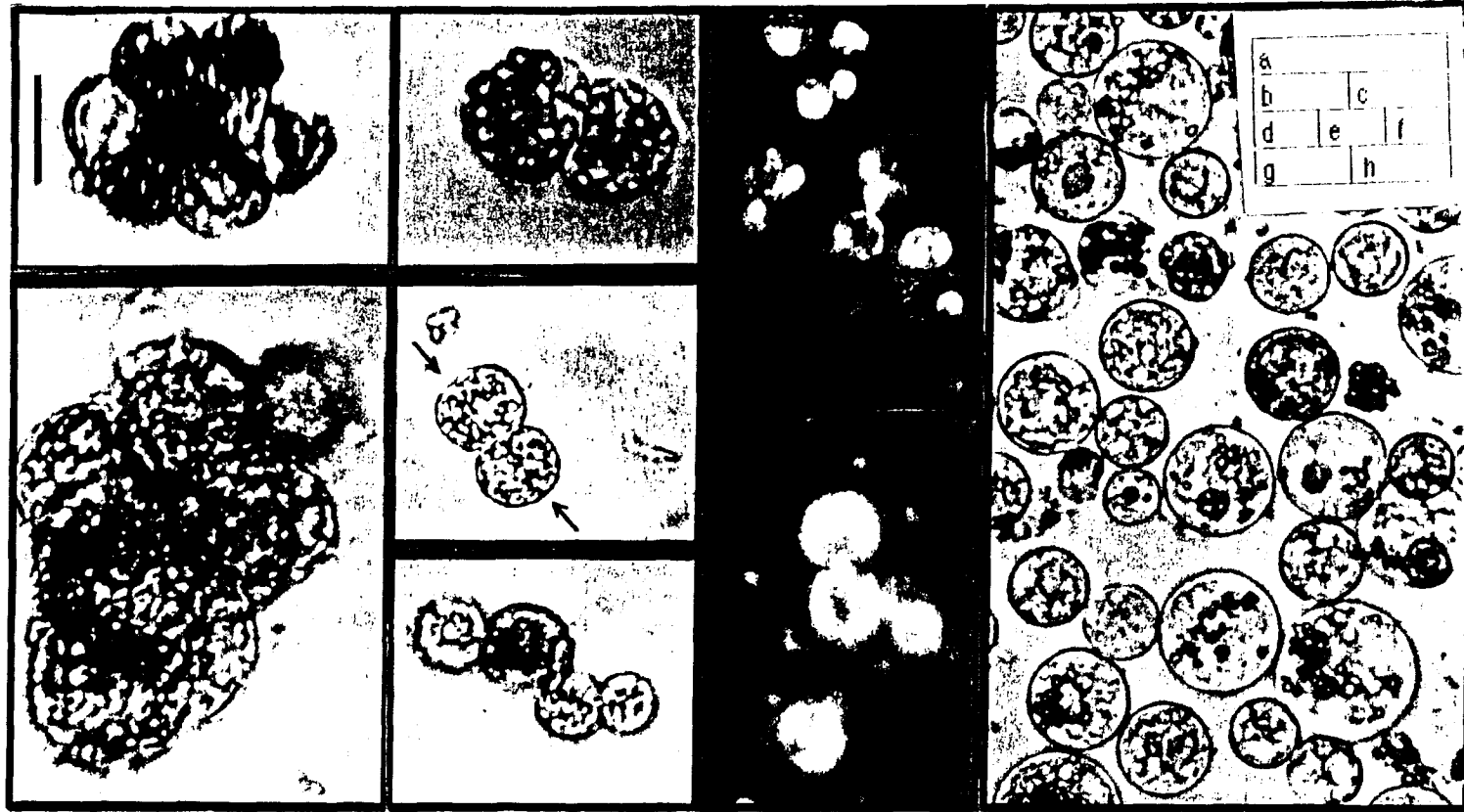


FIGURE 7: Protoplastes de *Lactuca decidue* avant et après culture

a: Protoplastes de cals de cotylédons traichement purifiés,

b: Test de viabilité après 1 jour de culture, Protoplastes vivants = fluorescence verte

c: Test de régénération des parois après 1 jour de culture,

Protoplastes ayant régénéré = Fluorescence Bleu-violette,

d: Stade première division après 5 jours de culture ( 2 cellules filles ),

e: Stade début de la seconde division ( flèches ) après 5 jours de culture

f: Stade 4 cellules après 7 jours de culture,

g: Stade 8 cellules après 10 jours de culture,

h: Stade microcol | 15 à 20 cellules | après 22 jours de culture

Echelle: Barre = 20 µm pour l'ensemble des photographies

glucidique satisfaisante pour les exigences des protoplastes en début de culture. Cette balance doit cependant être réajustée pour les phases ultérieures afin de prolonger l'activité mitotique des microcals.

**Remerciements :** *Nous remercions le laboratoire de Biologie des Ligneux ( Nancy ), le Réseau International des Biotechnologies ( Paris ), le CIES ( Paris) et l'INRA (Orléans) qui ont bien voulu prendre ce travail en charge.*

## Références

- ATTREE S.M, BEKKAOUI F, DUNSTAN D.I et FOWKE L.C, 1978 – Regeneration of somatic embryos from protoplasts isolated from embryogenic suspension culture of white spruce (*Picea glauca*) ; *Plan Cell Rep* ; 6 ; 480 – 483.
- BEKKAOUI F, SAXENA P.K , ATTREE S.M , FOWKE L.C et DUNSTAN D.I , 1978 – The isolation and culture of protoplasts from an embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* (Moench) Yoss ; *Plant Cell Rep* ; 6 ; 476 – 479.
- BOURGKARD F, et FAVRE J.M, 1988 – Somatic embryos from callus of *Sequoia sempervirens* ; *Plant Cell Rep* ; 7 ; 445 – 448.
- BORNMAN J.F et BORNMAN Ch, 1983 – Protoplast viability. A relative concept; In 6<sup>th</sup> Int. protoplast symp, Basel, Switzerland, *Experientia suppl* ; 45 ; 208– 209.
- DAVID A, 1987 – Conifers protoplasts in : Cell and tissue culture in forestry; Vol. 2; 2–15; Eds J.M Bonga and D.J Durzan ; *Martinus Nijhoff Publishers*.
- DAVID A et DAVID H, 1979 – Isolation and callus formation from cotyledon protoplasts of pine ( *Pinus pinaster*) ; *Z Pflanzenphysiol* ; 94 ; 173–177.
- DAVID H, JARLET E, et DAVID A, 1984 – Effects of nitrogen source, calcium concentration and osmotic stress on protoplasts and protoplast-derived cell culture of *Pinus pinaster* cotyledons ; *Physiol. Plant* ; 61 ; 477 – 482.
- GAUTHERET R, 1959 – La culture des tissus végétaux ; Ed. Masson Paris ; 863 p.
- GUPTA P.K, DANDEKAR A.M, et DURZAN D.J 1988 – Somatic proembryo formation and transient expression of a luciferase gene in douglas-fir and loblolly pine protoplasts ; *Plan Sci* ; 58 ; 85 – 92.
- GUPTA P.K, et DURZAND .J, 1986 – Plantlet regeneration and somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) ; *Cellular & developmental biology* ; 22 ; 685 – 688.
- GUPTA P.K et DURZAND. J, 1987a – Somatic embryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (Loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen ; *Can. j. For. Res* ; 17 ; 1130 – 1134.

- GUPTA P.K, et DURZAN D.J, 1987b – Biotechnology of somatic polymembryogenesis and plantlet regeneration of loblolly pine ; *Biotechnology* ; 5 ; 147 – 151 .
- HAKMAN I.C et FOWKE L.C, 1987 – An embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* ( White spruce) ; *Plant Cell Rep* ; 6 ; 20–22.
- HAKMAN I.C et VON ARNOLD S, 1983 – Isolation and growth of protoplasts isolated from cell suspension of *Pinus contorta* Dougl. ex Loud ; *Plant Cell Rep* ; 2 ; 92 – 94.
- HAKMAN I.C et VON ARNOLD S, 1985 – Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce) ; *J. Plant. Physiol* ; 121 ; 149–158.
- KIRBY E.G., 1980 – Factors affecting proliferation of protoplasts and cell culture of douglas–fir. In *Plant cell culture : results and perspectives* ; 289–293 ; Ed F. Sala, B. Parisi, R. Cella, O. Cifem, Elsevier North Holland Biomed Press.
- KIRBY E.G., 1981 – The isolation and culture of conifer protoplasts. In : *Colloque international sur la culture in vitro des essences forestières* ; 348–354 ; IUFRO, Fontainebleau, France, Ed. AFOCEL.
- KIRBY E.G et CHENG T, 1979 – Colony formation from protoplasts derived from douglas–fir cotyledons ; *Plant Sci. Lett* ; 14 ; 145–154.
- KLIMASZEWSKA Ch., 1988 – Recovery of somatic embryos from protoplast cultures of hybrid larch; 4<sup>th</sup> Intern. conifer tissue culture work group ; Saskatoon (Canada).
- KNOP W, 1865, *Quantitative Untersuchungen uber des Emahrungsprozess der Pflanzen*; *Landw. Versuchs. Stat* ; 7 ; 93 – 107.
- KOUIDER M, HAUPTMANN R, WIDHOLM J.M, SKIRYINR.M, et KORBAN S.S, 1984 – Callus formation from *Malus x domestica* cv. Jonathan protoplasts ; *Plant Cell Rep* ; 3 ; 142 – 145.
- KROGSTRUP P., 1986 – Embryolike structures from cotyledons and ripe embryos of norways spruce ( *Picea abies*) ; *Can. J. For. Res* ; 16 ; 664 – 668.
- LELU M.A, BOULAY M et ARNAUD Y, 1987– Obtention de cals embryogènes à partir de cotylédons de *Picea abies* (L.) Karst prélevés sur de jeunes plants âgés de 3 à 7 jours après germination ; *C.R. Acad. Sci. Paris, ser. III* ; 305 ; 105–109.

MURASHIGE T et SKOOG F, 1962 – A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture ; *Physiol Plant* ; 15 ; 473 – 497.

NAGATA T et TAKEBE I, 1970 – Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts ; *Planta* ; 92 ; 301– 308.

PATEL K.R, SHEKHAWAT N.S, BERLYN G.P et THORPE T.A, 1984 – Isolation and culture of protoplasts isolated from cotyledons of *Pinus coulteri* ; *Plant Cell Tissue Organ Cult* ; 3 ; 85 –90.

RANGIL S. et GORDON M, 1986 – Differential rates uptake of glucose, fructose and sucrose by pea stem protoplasts ; *J. Exptl. Bot* ; 181 ; 1164 – 1169.

RUSSEL J.A et MCCOWN B.H, 1986 – Culture and regeneration of populus leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue ; *Plant Sci* ; 46 ; 133 – 142.

SITA G. L et RANI B.S, 1983 – Preliminary studies on isolation and culture of protoplasts from sandal wood (*Santalum album*) ; In 6<sup>th</sup> Int. protoplast symp, Basel, Switzerland ; *Experientia suppl* ; 45 ; 4–5.

SLAOUI M. , 1986 – Premiers essais de préparation de protoplastes à partir de feuilles chez le chêne prédonculé (*Quercus robur* L.) ; mém. D.E.A. Université de Nancy I ; France ; 36 p.

SONDAHL M.R, CHAPMAN M.S et SHARP W.R, 1980 – Protoplast liberation, cell wall reconstitution and callus proliferation in *Coffea arabica* L. callus tissues ; *Tumalba*; 30 ; 161–165.

TEASDALE R.D et RUGINI E, 1983 – Préparation of viable protoplasts from suspension-cultured loblolly pine (*Pinus taeda*) cells and subsequent regeneration to callus ; *Plant Cell Tissue Organ Cult* ; 2 ; 253–261.

VON ARNOLD S et HAKMAN I.C, 1986 – Effect of sucrose on initiation of embryogenic callus cultures from mature zygotic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. (norway spruce) ; *J. Plant. Physiol* ; 122 ; 261 – 265.