

Cals embryogènes haute fréquence issus de plantules de semis chez *Carica papaya* L. : obtention et germination des embryons somatiques

S. MONMARSON
N. MICHAUX FERRIERE
C. TEISSON

BIOTROP/CIRAD
BP 5035
34032 Montpellier cedex 1

Cals embryogènes haute fréquence issus de plantules de semis chez *Carica papaya* L. : obtention et germination des embryons somatiques.

RÉSUMÉ

Sur des portions de tiges, d'épicotyles ou de pétioles prélevés sur de jeunes vitroplants de papayers âgés de 2 mois, des cals embryogènes haute fréquence ont été formés après transfert successif mensuel sur 3 milieux de culture différents. Le cal embryogène haute fréquence est formé sur le milieu M3 : il est constitué de cellules de type embryogène évoluant en embryon d'origine unicellulaire. Une amélioration du pourcentage de germination de ces embryons est obtenue par l'adjonction d'acide gibbérélique (GA3) au milieu de culture, et le maltose utilisé comme source carbonée favorise la qualité du système racinaire des plantules. La comparaison entre les pourcentages de germination des embryons somatiques et des embryons zygotiques isolés avec ou sans albumen, montre que la composition du milieu de germination peut être encore améliorée.

MOTS CLÉS

Carica papaya, cal, embryon somatique, germination, milieu de culture, gibbéréline, maltose, saccharose.

High Frequency Embryogenic Calli Formed on *Carica papaya* L. Seedling Pieces: Somatic Embryo Development and Germination.

ABSTRACT

High frequency embryogenic calli formed on *in vitro* cultured pieces of stem, epicotyl and petiole from young 2-month-old papaya trees. Callus formation was obtained after three successive monthly cultures on a series of media. High frequency embryogenic calli obtained on M3 medium were composed of embryogenic cells which developed into embryos of unicellular origin. The addition of gibberellic acid (GA3) to the culture medium improved embryo germination. Maltose, used as a carbon source, enhanced the quality of root systems in the produced plantlets. A comparison of germination results for somatic embryos and isolated zygotic embryos, with or without albumen, indicated that the germination medium composition could be further improved.

KEYWORDS

Carica papaya, callus, somatic embryos, germination, culture media, GA, maltose, sucrose.

Callos embríogénos alta frecuencia procedentes de plántulas de siembras en *Carica papaya* L. : consecución y germinación de los embriones somáticos.

RESUMEN

En porciones de tallos, de epicótilos o de peciolos extraídos de papayos jóvenes (2 meses de edad) y cultivados *in vitro*, se formaron callos embríogénos alta frecuencia después de tres cultivos mensuales sucesivos en la serie de ambientes. Se forma el callo embríogénos alta frecuencia en el ambiente M3; dicho callo se compone de células de tipo embríogénos que evolucionan hasta convertirse en embriones de origen unicelular. Se obtiene un mejoramiento del porcentaje de germinación de esos embriones añadiendo ácido gibbélico (GA3) al medio de cultivo; la maltosa usada como fuente carbonada favorece la calidad del sistema radicular de las plántulas. La comparación entre los porcentajes de germinación de los embriones somáticos y de los embriones cigóticos aislados con o sin albumen muestra que la composición del ambiente de germinación puede aún ser mejorado.

PALABRAS CLAVES

Carica papaya, callo, embrión somático, germinación, medio de cultivo, ácido giberélico, maltosa, sucrosa.

●●●● introduction

L'embryogenèse somatique du papayer (*Carica papaya* L.), comme celle de plusieurs espèces voisines, semble relativement facile à réaliser et a été décrite depuis plusieurs années par de nombreux auteurs (rapportés par FITCH, 1993).

Les résultats les plus récents (FITCH, 1993) font également mention d'embryogenèse somatique à haute fréquence. Ces cals embryogènes haute fréquence correspondent à des cals friables permettant l'obtention d'un très grand nombre d'embryons somatiques. Toutes ces données font référence à une embryogenèse induite après callogenèse à partir d'embryons zygotiques immatures ou d'hypocotyles (LITZ et CONOVER 1981, 1982 ; FITCH et MANSCHARDT 1990 ; CHIEN *et al.*, 1991 ; FITCH, 1993). Seuls quelques résultats témoignent de la réussite de l'embryogenèse somatique haute fréquence à partir de tissus adultes (VEGA DE ROJAS et KITTO, 1991 ; MONMARSON *et al.*, 1995). Pourtant, c'est seulement cette origine qui permet d'envisager le clonage d'individus génétiquement non fixés, le papayer étant une plante allogame. Ces remarques prennent tout leur sens pour les programmes de transformation génétique qui ont déjà abouti à des succès notoires que ce soit par bombardement de microprojectiles (FITCH *et al.*, 1990) ou via *Agrobacterium* (FITCH *et al.*, 1993).

Ce processus d'embryogenèse somatique haute fréquence assez facile à obtenir chez le papayer comporte cependant des lacunes déjà mentionnées par d'autres auteurs :

- l'origine et la structure histologique de ces cals sont mal connues ;
- le pourcentage de germination des embryons obtenus est faible et les plantules formées présentent souvent des anomalies morphologiques.

Les expérimentations présentées ici sont fondées sur la mise en culture d'explants provenant de plantules ayant un potentiel élevé de production de cals embryogènes haute fréquence. Ce matériel de départ présente la même morphologie et structure histocytologique que les cals obtenus à partir de téguments internes de papayer (MONMARSON *et al.*, 1995) et reste plus

facilement disponible. L'amélioration de la qualité et du nombre d'embryons somatiques germés était l'objectif principal de ce travail.

●●●● matériel et méthodes

matériel végétal

Des portions de tiges, de pétioles et de racines (de 0,3 à 0,5 cm de longueur) ou de feuilles, sont prélevées sur de jeunes plants de papayer âgés de deux mois ayant été cultivés *in vitro* depuis leur germination.

Les capacités de germination des embryons somatiques obtenus sont comparées à celles des embryons zygotiques prélevés sur des graines mûres, isolés de leurs téguments et cultivés *in vitro* soit seuls, soit entourés de l'albumen.

milieux de culture

milieu M1 d'induction de la callogenèse

Le milieu de base MB contient des sels MS/2 (MURASHIGE et SKOOG, 1962), des vitamines définies par CHIEN *et al.* (1987), du sulfate d'adénine (370 μ M), de la glutamine (685 μ M) et du saccharose (120 mM). Le milieu de callogenèse M1 est obtenu en ajoutant au milieu MB un auxinomimétique, le 2,4-D (9 μ M).

Sur ce milieu, la culture dure de un à deux mois selon les protocoles expérimentaux.

milieu M2 d'expression de l'embryogenèse

Le milieu M2 d'expression de l'embryogenèse diffère du milieu précédent par les substances de croissance. M2 renferme du 2,4-D (0,09 μ M) et de la kinétine (1 μ M). La durée de culture sur ce milieu est de un mois.

milieu M3 d'expression du cal embryogène haute fréquence

Pour constituer le milieu M3 d'expression du cal embryogène haute fréquence, de

l'acide abscissique (0,5 μM) est ajouté au milieu M2. Ce milieu M3, renouvelé chaque mois, permet également l'entretien des cals embryogènes haute fréquence.

milieu de germination des embryons somatiques ou zygotiques

Ce milieu de germination contient les macroéléments et microéléments de LLOYD et MC COWN (1980) et les vitamines définies par YIE et LIAW (1977).

Une gamme de concentration de maltose (MA) et de saccharose (SA) est expérimentée. Les milieux, contenant 11, 22, 44, 88 et 176 mM de maltose ou de saccharose, sont nommés respectivement MA1 à MA5 et SA1 à SA5.

L'acide gibbérellique GA3 (1 μM) est testé en présence de différentes sources carbonées dans les milieux MA1G (MA1 + GA3) à MA5G et SA1G (SA1 + GA3) à SA5G. Les embryons somatiques sont placés sur ces milieux, à raison de deux embryons par tube, durant 10 ou 30 jours. Les embryons zygotiques issus de graines matures sont extraits de leurs téguments. Selon le cas, ils sont séparés ou non de leur albumen et placés sur le milieu SA3G pendant 10 jours pour comparer leur comportement à celui des embryons somatiques dans les mêmes conditions.

milieu de croissance

La composition de base du milieu de croissance est identique à celle du milieu de germination. Le sucre est soit du saccharose soit du maltose utilisés à la concentration de 44 mM. Il ne renferme pas de substances de croissance mais du charbon actif (0,03 %). Les jeunes plantes croissent sur ce milieu pendant trois mois en étant repiquées tous les mois, puis elles sont sevrées.

Les milieux M1, M2, M3 sont solidifiés par du Phytigel (0,2 %) et les milieux de germination et de croissance par de l'agar Difco (0,75 %). Leur pH est ajusté avant autoclavage à 5,8.

conditions de culture

Pour chaque étape de culture, la température est de 28 ± 1 °C. La callogenèse,

l'expression de l'embryogenèse et l'induction du cal embryogène haute fréquence s'effectuent en boîtes de Pétri à l'obscurité. La germination des embryons somatiques a lieu soit à l'obscurité soit à la lumière : leur croissance est réalisée en tubes, selon une photopériode de 12 h jour/12 h nuit, avec une intensité lumineuse de $50 \mu\text{m}^2/\text{sec}$.

histocytologie

Une dizaine d'explants (pétioles et tiges) cultivés sur les milieux M1, M2, M3 sont fixés hebdomadairement pendant dix semaines par une solution d'acroléine (2 %) et glutaraldéhyde (2 %) dans un tampon phosphate (0,2 M, PH 7,2) à laquelle est ajoutée de la caféine (1 %) pour précipiter *in situ* les polyphénols oxydés. Déshydratés, puis inclus dans la résine Kulzer 7100 (Labonord) ils sont sectionnés à une épaisseur de 3 μm avec le microtome LKB Historange. Les sections sont colorées par le PAS-Naphthol Blue Black. Le PAS colore spécifiquement en rouge les polysaccharides (MARTOJA et MARTOJA, 1967) et le Naphthol Blue Black révèle spécifiquement les protéines solubles ou de réserve en bleu noir (FISHER, 1968).

Les racines de jeunes plants croissant sur un milieu enrichi en saccharose ou en maltose sont fixées, incluses, coupées et colorées selon le même protocole.

● ● ● ● résultats et discussion

obtention de cals embryogènes haute fréquence

Différents types d'explants ont été cultivés sur la succession mensuelle de milieux M1, M1, M2, M3 afin de définir ceux qui exprimaient une potentialité embryogène. Le tableau 1 montre que si tous les types d'explants, à part ceux prélevés sur les feuilles, donnaient une forte proportion de cals après un mois de culture sur M1, seuls les morceaux de tiges, d'épicotyles et de pétiotes fournissaient des embryons après quatre mois.

Le début de callogenèse a pu être observé dès la deuxième semaine de culture ; après deux mois sur le milieu M1 le cal est devenu volumineux, friable, hyperhydrique et de couleur blanc crème. Les premiers embryons se sont formés sur le milieu M2 au cours du troisième mois de culture. Le passage sur le milieu M3 contenant de l'acide abcissique a modifié l'aspect de certains cals qui étaient alors moins hydriques et d'une couleur évoluant vers l'ocre. Sur ces cals, des embryons somatiques se sont alors formés en grand nombre.

Sur les trois catégories d'explants ayant donné une réponse embryogène, différents schémas expérimentaux ont été testés pour optimiser le pourcentage d'explants réactifs. C'est la succession mensuelle M1, M2, M3 (tableau 2) qui a fourni les meilleurs résultats. Les pourcentages obtenus, nettement supérieurs à ceux de l'expérimentation précédente réalisée avec la succession mensuelle M1, M1, M2 et M3 (tableau 1), tendent à démontrer que le maintien du cal sur M1 pendant deux mois perturbe l'expression de l'embryogénèse.

Le milieu M3 induit non seulement le caractère embryogène haute fréquence et

son expression, mais permet aussi la multiplication et l'entretien de ce type de cal. En effet, par des repiquages mensuels sur ce milieu, les cals ont été conservés avec leur potentialité embryogène pendant quatre ans.

Chez le papayer, différents explants ont fourni, avec des protocoles de culture variés, des cals embryogènes haute fréquence : suspensions cellulaires provenant de cals d'ovules fécondés (LITZ et CONOVER, 1982), racines de semis effectués *in vitro* (CHEN *et al.*, 1987), tiges de semis réalisés *in vitro* (YAMAMOTO *et al.*, 1986 ; YAMAMOTO et TABATA, 1989), embryons zygotiques immatures (FITCH et MANSHARDT, 1990), hypocotyle (FITCH, 1993) et tissus somatiques de jeunes graines (VEGA DE ROJAS et KITTO, 1991 ; MONMARSON *et al.*, 1995).

La présence d'acide abcissique permet, dans ces conditions de culture, l'entretien de la potentialité embryogène haute fréquence tout en favorisant un développement normal des embryons. CHEN *et al.* (1991) ainsi que CHEN et CHEN (1992) avaient déjà mis en évidence ce rôle de l'acide abcissique sur la multiplication en grand nombre d'embryons fils obtenus à partir d'embryons somatiques provenant de la culture d'embryons zygotiques immatures.

aspect histologique

Sur le premier milieu de culture M1, les explants étudiés (issus de tiges et pétioles) montrent que le cal est formé par la multiplication des cellules périvasculaires (flèches sur la photo 1). Sur le deuxième milieu, M2, ces cellules se multiplient (photo 2), s'isolent les unes des autres (photo 3) et forment un cal friable. Certaines de ces cellules se recloisonnent (photo 4) et évoluent en jeunes embryons globulaires qui sont à l'origine des premiers embryons formés (photo 5). Sur le milieu M3, le cal embryogène haute fréquence est constitué de cellules de type embryogène (photo 6) plus ou moins isolées les unes des autres, évoluant pour beaucoup d'entre elles en embryons (photo 7). Ces embryons somatiques ont une origine unicellulaire.

Tableau 1
Callogenèse et embryogénèse obtenues (en %) selon le type d'explant après respectivement un et quatre mois de culture. Succession mensuelle de milieux : M1, M1, M2 et M3.

Type d'explants	% de cals après 1 mois de culture	% de cals porteurs d'embryons après 4 mois de culture
Tiges	91	3
Epicotyles	99	3
Pétioles	91	2
Racines	90	0
Feuilles	4,5	0

Tableau 2
Embryogénèse obtenue (en %) après 3 mois de culture selon le type d'explants et la succession de milieux.

Types d'explants	Succession mensuelle de milieux			
	M1, M1, M2	M1, M1, M3	M1, M2, M3	M1, M3, M3
Epicotyles	19,2	5	47,2	9
Pétioles	0	0	38,5	4
Tiges	0	0	55,5	0

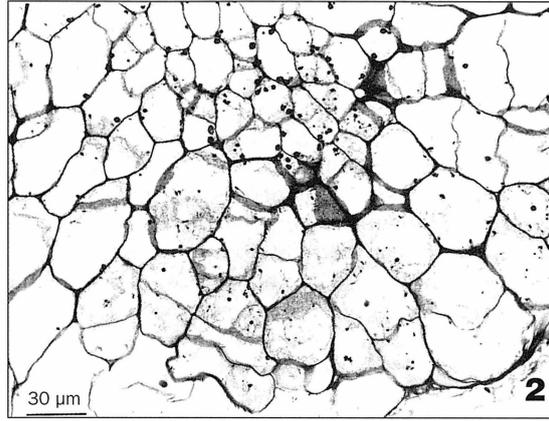
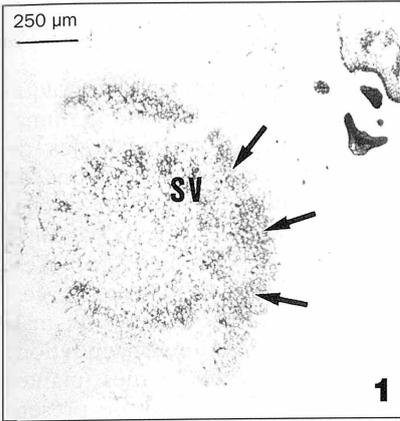


Photo 1
Section transversale d'un pétiole après une semaine de culture sur le milieu M1. Les cellules situées à la périphérie du système vasculaire SV se multiplient (flèches) et sont à l'origine du cal.

Photos 2 à 5
Evolution de cals formés sur des portions d'épicotyles cultivés sur le milieu M2 après passage pendant 1 mois sur le milieu M1.

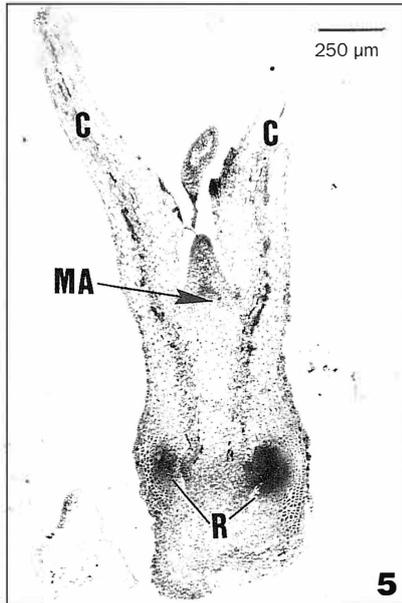


Photo 2
Aspect des cellules du cal formé sur le milieu M2 après une culture sur M1 durant 1 mois.

Photo 3
Formation du cal friable par isolement des cellules qui le constituent, sur milieu M2.

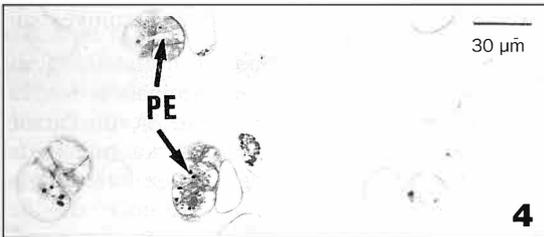


Photo 4
Recloisonnement cellulaire donnant naissance à de jeunes proembryons globulaires (PE) sur milieu M2.

Photo 5
Aspect histologique d'un embryon somatique formé sur le milieu M2.
C : cotylédons ;
MA : méristème apical ;
R : ébauches racinaires.

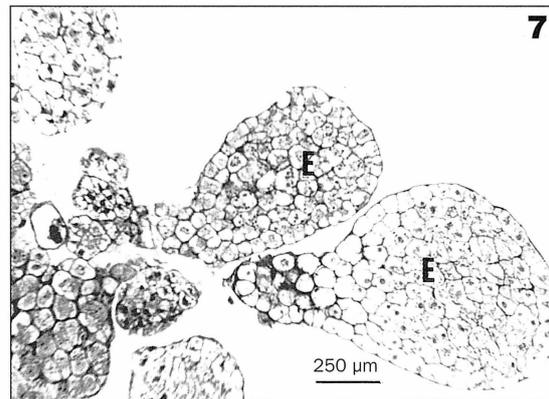
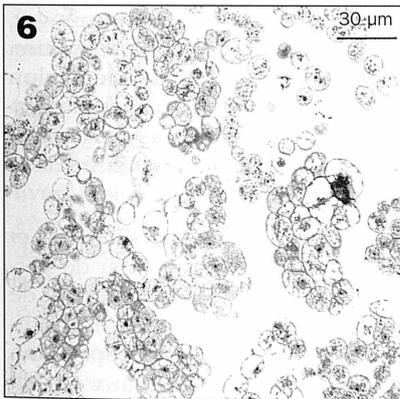


Photo 6
Aspect cytologique du cal embryogène haute fréquence formé sur le milieu M3 après 1 mois de culture sur M1 et 1 mois sur M2.

Photo 7
Jeunes embryons somatiques (E) formés par le recloisonnement des cellules embryogènes du cal.

germination et croissance des embryons somatiques

Dans nos conditions de culture, les embryons somatiques obtenus sur les cals embryogènes haute fréquence cultivés sur le milieu M3 ne germent pas spontanément. Des milieux de germination puis de croissance doivent être utilisés pour obtenir des plantes aptes à être sevrées. Selon les auteurs, la germination des embryons somatiques de papayer est plus ou moins aisée. CHEN *et al.* (1991) ainsi que CHEN et CHEN (1992) obtiennent 20 à 30 % de germination sur un milieu simple, sans hormones. FITCH et MANSHARDT (1990) utilisent un milieu enrichi en kinétine pour la germination ou un milieu contenant de l'acide indolbutyrique (AIB) pour permettre l'enracinement (FITCH *et al.*, 1993). Pour LITZ et CONOVER (1982) de l'acide naphthalène acétique (ANA) et de la benzylaminopurine (BAP) doivent être présents dans le milieu de germination. La nature de la source carbonée semble également très importante pour la germination et varie selon les espèces : le galactose et le sorbitol donnent de bons résultats sur *Citrus* (HIDAKA et OMURA, 1989) et le maltose améliore la qualité germinative des embryons somatiques chez de nombreuses espèces : cerisiers (DRUART, 1990), orge (ROBERTS-OEHLISCHLAGER

et al., 1990), luzerne (STRICKLAND *et al.*, 1987).

Des expériences préliminaires ont indiqué que les meilleures réponses de germination avec les embryons somatiques de papayer formés dans nos conditions de culture étaient obtenues avec du saccharose ou du maltose. Le tableau 3 montre qu'aucune différence significative n'est décelable entre les pourcentages de germination obtenus sur saccharose et maltose quelles que soient les concentrations utilisées. Cependant les jeunes plantes formées en présence de maltose présentent des racines lisses par rapport à celles qui germent et croissent sur des milieux contenant du saccharose. Une section longitudinale de ces deux types racinaires permet d'établir leur différence de structure. Pour un même diamètre moyen, les racines des jeunes plants cultivés sur maltose (photo 8) ont un tissu cortical plus mince et mieux structuré que celles des plants cultivés sur saccharose (photo 9). Celles-ci présentent un cortex désorganisé sans épiderme. MANSHARDT et WENSLAFF (1989) et FITCH *et al.* (1990) ont relevé également l'aspect "hydrique" des racines de jeunes plants de papayer cultivés sur saccharose.

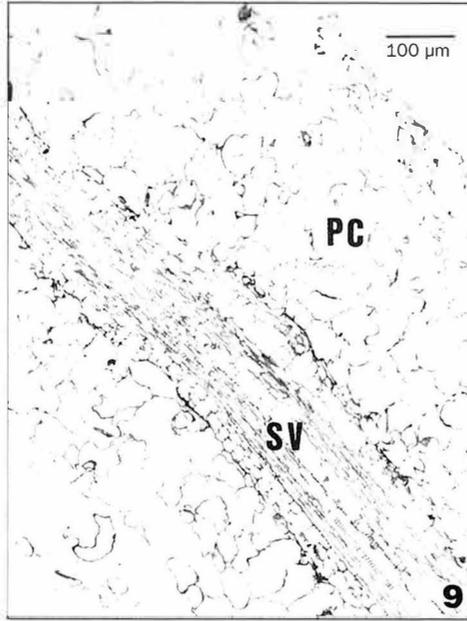
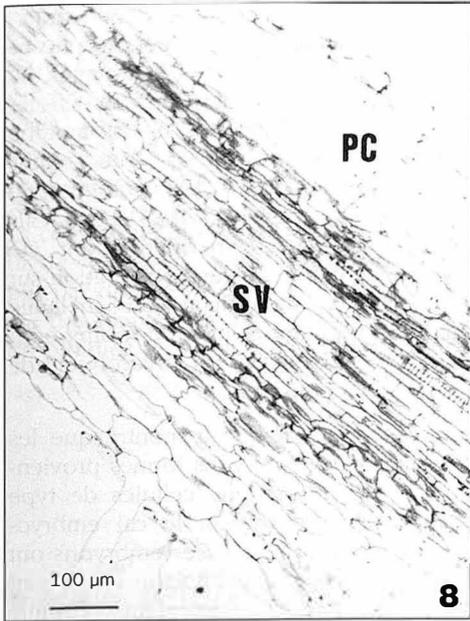
Les pourcentages de germination restant faibles (5 à 13 %, tableau 3), de l'acide gibbéréllique a été ajouté au milieu de germination. En effet, chez un certain nombre d'espèces, la présence d'acide gibbéréllique dans les milieux de germination augmente le taux de conversion des embryons somatiques (RANGASWAMY, 1986). Le tableau 4 montre que l'addition d'acide gibbéréllique à une concentration de 1 µM améliore le pourcentage de germination dans tous les cas envisagés, quels que soient le sucre utilisé et sa concentration.

Différentes solutions de macroéléments et de microéléments dans le milieu de germination ont été testées. Ce sont ceux de "Woody Plant medium" les plus fréquemment employés pour la propagation d'arbres et arbustes ornementaux (LOYD et MAC COWN, 1980) qui ont été les plus efficaces. Plus récemment, ils ont été utilisés avec succès pour la régénération de plants transformés de peupliers hybrides (HOWE *et al.*, 1994).

Tableau 3
Effet de la nature et de la concentration de la source de carbone du milieu de culture sur le taux de germination des embryons somatiques.

Sucres	Concentration (mM)	nb d'embryons somatiques	% d'embryons germés
Saccharose	11	184	7,1
	22	191	11,5
	44	192	13,5
	88	194	8,8
	176	192	5,2
Maltose	11	182	9,3
	22	184	9,2
	44	192	6,8
	88	190	7,9
	176	192	9,9

Pour une concentration donnée de saccharose et de maltose, le taux d'embryons obtenus ne sont pas significativement différents (Test Chi 2, comparaison de profils).



Photos 8 et 9
 Sections longitudinales axiales de racines de jeunes plantes issues d'embryons somatiques cultivés sur milieux enrichis en maltose MA3G (44 mM + acide gibbérellique 1 μm) (photo 8) ou en saccharose SA3G (44 mM + acide gibbérellique 1 μm) (photo 9).
 PC : parenchyme cortical ; SV : système vasculaire.

comparaison du comportement des embryons somatiques et zygotiques

Dans le but d'augmenter le pourcentage de germination des embryons somatiques (22,9 % dans le meilleur des cas, tableau 4), leur comportement a été comparé à celui d'embryons zygotiques. Le tableau 5 présente les pourcentages de germination obtenus à partir de graines entières mises en culture en serre, de graines entières mises à germer *in vitro*, et d'embryons zygotiques isolés des téguments de la graine entourés ou non de l'albumen et cultivés *in vitro*. La germination est attestée par l'allongement de l'hypocotyle et l'émergence de racines. Les résultats mettent en évidence les capacités germinatives limitées des graines *in vitro* et *in vivo* (50 à 56 %) et surtout le rôle positif de la présence de l'albumen sur la germination *in vitro* des embryons zygotiques isolés (66 % contre 11 %).

Les embryons zygotiques isolés sans albumen constituent le modèle se rapprochant le plus des embryons somatiques. Leur pourcentage de germination obtenu après 10 jours de culture à l'obscurité sur le milieu SA3G a donc été comparé à celui des embryons somatiques. Ces pourcen-

Tableau 4

Effet de la présence d'acide gibbérellique (GA3) sur le pourcentage de germination selon la source carbonée utilisée.

Sucres	Concentration (mM)	GA3 (μM)	Milieux	% embryons germés
Saccharose	11	0	SA1	4,5
			SA2	3,1
			SA3	4,2
			SA4	3,1
			SA5	1
	22	1	SA1G	9,4
			SA2G	20
			SA3G	22,9
			SA4G	14,6
			SA5G	9,4
	44	1	SA1G	9,4
			SA2G	20
			SA3G	22,9
			SA4G	14,6
SA5G			9,4	
88	1	SA1G	9,4	
		SA2G	20	
		SA3G	22,9	
		SA4G	14,6	
		SA5G	9,4	
176	1	SA1G	9,4	
		SA2G	20	
		SA3G	22,9	
		SA4G	14,6	
		SA5G	9,4	
Maltose	11	0	MA1	4,2
			MA2	2,3
			MA3	2,1
			MA4	2,1
			MA5	0
	22	1	MA1G	15,1
			MA2G	15,3
			MA3G	11,5
			MA4G	13,5
			MA5G	19,8
	44	1	MA1G	15,1
			MA2G	15,3
			MA3G	11,5
			MA4G	13,5
MA5G			19,8	
88	1	MA1G	15,1	
		MA2G	15,3	
		MA3G	11,5	
		MA4G	13,5	
		MA5G	19,8	
176	1	MA1G	15,1	
		MA2G	15,3	
		MA3G	11,5	
		MA4G	13,5	
		MA5G	19,8	

Les % d'embryons germés obtenus sur SA sont significativement différents de ceux obtenus sur SAG et les % sur MA sont significativement différents de ceux obtenus sur MAG à 1 % par test Chi 2 (comparaison de profils).

Tableau 5

Comparaison des taux de germination de divers matériels après 10 jours de culture.

	Graines serre ¹	Graines CIV ²	Embryon zygotique + albumen ²	Embryon zygotique sans albumen ²
Effectif	100	50	50	50
%	56	50	66	11

(1) graines mises à germer en terre sous serre.

(2) matériel cultivé *in vitro* sur le milieu SA3G (saccharose 44 mM + acide gibbéréllique 1 µm).

Tableau 6

Comparaison de la germination d'embryons zygotiques et somatiques sur milieu SA3G* de germination à l'obscurité.

Types d'embryons	Effectif	% d'embryons germés
Zygotiques sans albumen	204	35
Somatiques	215	43

*SA3G : saccharose 44 mM + acide gibbéréllique 1 µm.

tages ne sont pas significativement différents entre eux (43 et 35 %, tableau 6). Ils restent inférieurs à ceux obtenus lors de la germination de graines entières *in vivo* (56 %) ou d'embryons mis à germer *in vitro* avec leur albumen (66 %). Ces résultats semblent prouver que le milieu de culture lors de la germination est incapable de remplacer complètement l'albumen. Sa composition pourrait donc encore être améliorée.

● ● ● ● conclusions

Des cals embryogènes haute fréquence ont déjà été obtenus chez le papayer à partir d'embryons zygotiques immatures (CHEN *et al.*, 1991 ; FITCH et MANSHARDT, 1990), de racines (CHEN *et al.*, 1987) ou d'hypocotyles de très jeunes plantes (FITCH, 1993).

Peu d'éléments précis concernant l'entretien de ce type de cal sont fournis. Seuls CHEN *et al.* (1991) constatent une formation d'embryons apparemment continue lorsque le milieu contient de l'ABA. Nos résultats démontrant l'initiation du cal embryogène haute fréquence lors du transfert de l'explant sur un milieu enrichi en ABA contribuent à faire jouer à cette

hormone un rôle particulier dans l'induction et le maintien en prolifération de ce type de cal, du moins chez le papayer. Ce fait n'est pas général. Chez le caféier (SONDAHL et SHARP, 1977), la luzerne (MEIJER et BROWN, 1987), l'eucalyptus (MURALIDHARAN *et al.*, 1989), la carotte (NOMURA et KOMAMINE, 1985), des cals embryogènes haute fréquence ont été obtenus et maintenus en prolifération sur des milieux renfermant un mélange auxine-cytokinine et plus ou moins enrichis en glutamine, en hydrolysats de caséine ou en proline.

L'analyse histologique a montré que les très nombreux embryons formés proviennent de l'évolution de cellules de type embryogène constituant le cal embryogène haute fréquence. Ces embryons ont bien une origine unicellulaire et ne sont pas des embryons secondaires comme ceux obtenus par CHEN *et al.* (1991).

La définition des conditions optimales de germination des embryons somatiques obtenus sur ces cals embryogènes haute fréquence a montré l'effet bénéfique de la GA3, ce qui a déjà été mis en évidence pour beaucoup d'espèces. Sans comprendre exactement son rôle, on constate que l'adjonction de GA3 au milieu de germination des embryons augmente la fréquence de germination chez *Juglans regia* (DENG et CORNU, 1992) et chez les *Citrus* (HIDAKA et OMURA, 1989). Il lève la dormance des embryons et stimule l'enracinement chez diverses espèces : *Citrus*, bois de sental et maïs (RANGASWAMY, 1986). L'efficacité du maltose, comme source carbonée dans le milieu de germination, sur la qualité et la fréquence de germination a été également observée sur les embryons somatiques de luzerne (STRICKLAND *et al.*, 1987).

Dans le cadre de nos expérimentations les taux de germination des embryons somatiques de papayer restent, malgré tout, encore faibles. Il est intéressant de noter qu'ils sont voisins de ceux des embryons zygotiques sans albumen mis à germer dans les mêmes conditions. La composition du milieu de germination semble donc être en cause. Chez l'hévéa, 95 % d'embryons zygotiques matures germent *in vitro* sans avoir besoin d'albumen (ETIENNE *et al.*, 1993).

- LITZ R., CONOVER R.A., 1982.
In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. *Plant Science Letters*, 26, 153-158.
- LLOYD G.B., MC COWN B., 1980.
 Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427.
- MANSHARDT R., WENSLAFF T.F., 1989.
 Zygotic polyembryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* and *Carica cauliflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114 (4), 684-689.
- MARTOJA R., MARTOJA M., 1967.
 Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris (France) : Masson et Cie, 345 p.
- MEIJER E.G.M., BROWN D.C.W., 1987.
 Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10, 11-19.
- MONMARSON S., MICHAUX-FERRIERE N., TEISSON C., 1995.
 Production of high frequency embryogenic calli from integuments of *Carica papaya* L. *The Jour. of Hort. Science*, 70 (1), 57-64.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962.
 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum*, 15, 473-497.
- MURALIDHARAN E.M., GUPTA P.K., MASCARENHAS A.F., 1989.
 Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Reports*, 8, 41-43.
- NOMURA K., KOMAMINE A., 1985.
 Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.*, 79, 988-991.
- RANGASWAMY N.S., 1986.
 Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)*, 96 (4), 247-271.
- ROBERT-OEHLISHLAGER S., DUNWELL J., FAULKES R., 1990.
 Changes in the sugar content of barley anthers during culture on different carbohydrates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22, 77-85.
- SONDHAL M.R., SHARP W.R., 1977.
 High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, Bd 81, S, 395-408.
- STRICKLAND S.G., NICHOL S.G., Mc CALL C.M., STRUART D.A., 1987.
 Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. *Plant Sci.*, 48, 113-121.
- VEGA DE ROJAS R., KITTO S.L., 1991.
 Regeneration of Babaco (*Carica pentagona*) from ovular callus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116 (4), 747-752.
- YAMAMOTO H., TANAKA S., FUKUI H., TABATA M., 1986.
 Enzymatic difference between laticifers and cultured cells of papaya. *Plant Cell Reports*, 5, 269-272.
- YAMAMOTO H., TABATA M., 1989.
 Correlation of papain like enzyme production with laticifer formation in somatic embryos of papaya. *Plant Cell Reports*, 8, 251-254.
- YIE S., LIAW S.I., 1977.
 Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro*, 13 (9), 564-568.

