



# Effet de la photopériode et des vitamines sur la micropropagation du bananier plantain (*Musa AAB*) à partir de rejets écailles de rang 1

[Effect of photoperiod and vitamins on there micropropagation of the banana plantain (*Musa AAB*) starting from sucker at position 1]

**KONE Tchoa** <sup>1\*</sup>, **KONE Mongomaké** <sup>1</sup>, **KONE Daouda** <sup>2</sup>, **KOUAKOU Tanoh Hilaire** <sup>1</sup>, **TRAORE Siaka** <sup>3</sup>, **KOUADIO Yatty Justin** <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université d'Abobo-Adjamé, UFR des Sciences de la Nature, Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales ; 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire ; <sup>2</sup> Université de Cocody Abidjan, UFR Biosciences, Laboratoire de Physiologie Végétales, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire ; <sup>3</sup> Centre Nation de Recherche Agronomique (CNRA), Station de Recherche de Bimbresso, Laboratoire de Phytopathologie, 01 BP 1536 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

\*Auteur en correspondance : konetchoa@yahoo.fr

Original submitted on 29<sup>th</sup> December 2009. Published online at [www.biosciences.elewa.org](http://www.biosciences.elewa.org) on February 12, 2010.

## RESUME

**Objectifs:** Evaluer l'influence de l'obscurité et de la formulation vitaminique sur la micro propagation de deux cultivars de bananier plantain (*Musa* spp. AAB), en vue de produire à grande échelle de jeunes plants de bananier.

**Méthodologie et résultats :** Des rejets de rang 1 (premier rejet à apparaître et n'ayant pas subit d'inhibition du pied mère) issus de plants des cultivars Orishele et Corne 1 ont été utilisés comme source d'explants. Ces explants sont constitués des bourgeons apicaux prélevés à partir de rejets conservés ou non. Deux cycles photopériodiques et deux formulations vitaminiques ont été testés pour la production en masse de plants. Les explants de rejets conservés ont exprimé des taux de contamination et de nécrose importants chez le cultivar Corne1. Chez ces deux cultivars, le nombre moyen de bourgeons a été plus important en présence des vitamines Morel en condition d'obscurité avec  $13,49 \pm 2,63$  chez Orishele et  $10,33 \pm 2,35$  chez Corne 1 en soixante jours.

**Conclusions et application des résultats :** Les résultats obtenus montrent que les rejets de rang 1 utilisés après récolte sont favorables à l'initiation de la culture *in vitro* de bananier plantain. L'obscurité a amélioré de manière significative la prolifération *in vitro*. La prolifération est précoce dans nos conditions expérimentales et accroît par conséquent le nombre de pousses utilisables pour la production de matériel végétal. L'étude au champ des plants produits à partir de ces deux photopériodes permettra de vérifier leur conformité et de valider cette méthodologie pour la multiplication *in vitro* du bananier plantain. Ainsi, des plants sains, vigoureux et homogènes seront régulièrement mis à la disposition des paysans. En outre, l'utilisation des traitements chimiques (nématocide et insecticide) et hormonal, pour l'amélioration de la qualité du fruit et la précocité de la floraison, sera considérablement réduite.

**Mots clés:** *Musa AAB*, rejet écaïlle, micropropagation, obscurité, vitamines.



## ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate the influence of darkness and vitamin formulation on micropropagation of two plantain (*Musa* sp. AAB) cultivars.

**Methodology and results:** Sucker at position 1 (the first sucker to emerge from the mother plant) of plantain cultivars Orishele and Corne 1 were used as source of explants. The explants consisted of the apical buds taken from corms that had been preserved or freshly harvested. Two photoperiod cycles and two vitamin formulations were tested for the mass production of seedling. Explants from the preserved corms expressed higher rates of contamination and necroses in cultivar Corne1. In both cultivars, the average number of shoots was more in the presence of the Morel vitamins under darkness, with  $13.49 \pm 2.63$  in Orishele and  $10.33 \pm 2.35$  in Corne 1 in sixty days.

**Conclusions and application of findings:** These result showed that corms of rank 1 are more favourable to the initiation of *in vitro* culture of banana plantain when used immediately after harvest. Darkness improved *in vitro* proliferation significantly and proliferation occurred earlier. Field studies are proposed using seedlings produced using the tested methods to validate this methodology of *in vitro* multiplication of plantain which will deliver healthy, vigorous and homogeneous seedlings to farmers and also reduce the use of the chemical pesticides (nématocide and insecticide) and hormonal treatments in banana production.

**Keys words:** *Musa* AAB, buds scales, micropropagation, darkness, vitamins.

## INTRODUCTION

La banane plantain (*Musa* AAB) constitue un aliment de base traditionnel très important en Côte d'Ivoire. Elle occupe le 4<sup>e</sup> rang des produits vivriers en termes de consommation après le riz, le manioc et l'igname (ANADER, 2009). C'est la principale source alimentaire pour plus de 400 millions de personnes à travers le monde et particulièrement dans les pays tropicaux (Jones, 2000). La plante représente aussi une source substantielle de revenus pour de nombreuses populations rurales et urbaines. Elle est généralement produite en culture de case ou en association avec d'autres cultures (l'igname, le manioc, l'aubergine ou les cultures industrielles telles que le café et le cacao). L'association est la principale forme de production de la banane plantain (Nkendah & Akyeampong, 2003). La monoculture, rarement pratiquée est effectuée sur de petites surfaces.

La plupart des cultivars de banane produisent des fruits aspermes. Leur propagation se fait à partir de rejets issus de la plante mère et qui constituent le matériel de plantation classique. Cette voie de multiplication naturelle est lente, laborieuse et produit des rejets en quantité réduite et surtout de faible qualité phytosanitaire. En outre, il est difficile d'obtenir des rejets dont la disponibilité est due aux variations climatiques. Ce manque de matériels végétal de qualité sanitaire

satisfaisante constitue une contrainte majeure pour l'extension et la pérennisation des plantations de bananiers dans de nombreux pays.

Les techniques de régénération *in vitro* chez les Musacées ont largement été utilisées comme méthodes alternatives à la propagation traditionnelle. Ces dernières années, la propagation de la banane à partir de culture de tissu a connu un essor à cause de l'aptitude de cette technique à produire du matériel génétiquement uniforme et sain. Cependant, certaines instabilités génétiques ont été rencontrées chez les plantes régénérées à partir de cals, à la suite de subcultures répétées ; de culture de protoplastes ou de suspensions cellulaires (Assani *et al.* 2002 ; Strosse *et al.* 2006 et 2008). L'organogénèse directe à partir de méristèmes apical serait indiquée pour assurer une micropropagation destinée à la production commerciale de plants de bananier plantain. Par ailleurs, cette voie permet d'obtenir des plantes saines, indemnes de maladies et génétiquement plus stables (Afza *et al.* 1996). Les bananiers obtenus à partir de culture de tissus ont un cycle précoce et un rendement élevés par rapport à ceux issus de la multiplication naturelle (Adelaja, 1995).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur la multiplication du bananier à partir d'apex

(Ganapathi *et al.* 1995). La stimulation de la multiplication des pousses par la variation du type et de la concentration des régulateurs de croissance et des sources de carbones ont été rapportés par Madhulatha *et al.* (2006) et Michael *et al.* (2006). Novak *et al.* (1990) et Mbanaso *et al.* (2006) ont effectué des incisions sur l'apex de *Musa* afin de stimuler la production en masse de pousses. D'autres auteurs ont adaptés divers types de bioréacteurs ou des systèmes d'immersion temporaire pour augmenter les taux

## MATERIEL ET METHODES

**Matériel végétal :** Le matériel végétal est constitué de deux cultivars de bananiers plantain de type faux corne : Orishele et Corne 1 (*Musa AAB*). Ces bananiers sont cultivés sur la parcelle expérimentale de l'Université d'Abobo-Adjamé. Les rejets écailles de rang 1 (premier rejet à apparaître et n'ayant pas subi d'inhibition du pied mère) prélevés sur les bananiers ont été utilisés comme source d'explants.

**Prélèvement des rejets et préparation des explants :** Afin de disposer de suffisamment de rejets pour réaliser les expérimentations, le prélèvement progressif et la conservation du matériel de culture ont été entrepris. Dans cette partie de l'étude, il était important de savoir l'influence de la conservation des rejets sur les réponses des explants à la phase d'initiation. Les rejets écailles séparés du pied mère ont alors été répartis en deux lots. Les rejets du premier lot ont été immédiatement utilisés. Ceux du second lot ont été conservés au laboratoire à une température de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  et une humidité relative de 35 à 40 %, pendant deux à trois jours avant leur utilisation.

Les rejets ont successivement été lavés à l'eau de robinet, puis avec un savon liquide Multi-usages (SUPER CLEAN, SIPRO-CHIM) pendant 10 min. Après le lavage, les rejets ont été parés avant de subir un bain d'éthanol à  $70^\circ$  (v/v) pendant 30 secondes. Ensuite, ils ont été immergés dans une solution d'hypochlorite de calcium (Madhulatha *et al.* 2006) 7% (m/v) contenant 0,1% (v/v) Tweens 20, pendant 30 minutes. Au bout des 30 minutes de désinfection, les organes ont été rincés trois fois successivement avec de l'eau distillée stérile, puis à nouveau épluchés de sorte à obtenir des cylindres de dimensions  $1 \times 0,5$  cm (présence d'ébauche foliaire) ou  $0,5 \times 0,25$  cm (méristème nu).

**Initiation des cultures :** Les explants ont été placés

de multiplication des plants de bananiers (Lorenzo *et al.*, 1998 ; Etienne & Betthouly, 2002 ; Matsumoto & Kaizer-Brandão, 2002).

Toutefois, aucun de ces rapports n'a signalé l'influence de la photopériode et de la formulation vitaminiques sur les potentialités de la micropropagation du bananier plantain. L'objectif de la présente étude a été d'évaluer l'influence de l'obscurité et de la formulation vitaminique sur la micropropagation de deux cultivars de bananier plantain (*Musa* spp. AAB).

sur le milieu de base MS (Murashige & Skoog, 1962) contenant 1,238 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 80 mg/l d'acide ascorbique et 30 g/l de saccharose. Ce milieu supplémenté avec la BAP ( $\text{N}^6$ -Benzylaminopurine, 2 mg/l) a été solidifié avec l'agar (5 g/l). Les cultures ont été incubées dans une salle de culture à l'obscurité continue pendant une semaine avant d'être exposées sous une intensité lumineuse de  $30\text{-}40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Une photopériode de 12 h et une température  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  ont été fixées. Après quatre semaines de culture, les réponses des explants en termes de taux de contamination et de nécrose ont été évaluées. Après la phase d'initiation, les explants viables ont ainsi été utilisés pour étudier leur aptitude à induire des bourgeons.

**Phase de multiplication :** Les explants viables ont été transférés sur le milieu de base MS additionné de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1,238 mg/l), d'adénine hémisulfate (80 mg/l), de saccharose (30 g/l) et d'acide ascorbique (80 mg/l). Une concentration élevée de BAP (5 mg/l) a été utilisée et le milieu a été solidifié avec de l'agar (5 g/l). Au cours de cette phase, l'effet de deux formulations vitaminiques a été déterminé. Il s'agit des vitamines MS (Murashige & Skoog, 1962) et celles de Morel (1950). Par ailleurs, les cultures ont été soumises à deux photopériodes. Il s'agit de l'obscurité continue et d'une photopériode de 12 heures. Pour chaque traitement, 15 explants / formulation vitaminique / photopériode ont été réalisées. Les expériences indépendantes ont été répétées trois fois. Après 8 semaines de culture, la fréquence d'induction des bourgeons et le nombre moyen de bourgeons par explants ont été déterminés.

**Elongation et enracinement des pousses feuillées :** Les bourgeons induits ont été séparés des explants puis transférés sur un milieu de même composition que celui de la phase d'initiation. Toutefois, pour lutter contre le phénomène d'oxydation des milieux, le

charbon actif (2 g/l) a été utilisé. Les cultures ont été placées sous deux photopériodes différentes. La première condition est composée de deux semaines d'obscurité, afin de stimuler le développement des bourgeons, suivie d'une photopériode de 12 h. Dans la deuxième, les cultures ont été soumises à une photopériode de 12 h pendant toute la durée de cette phase. Le taux de rhizogénèse et la taille des pousses feuillées ont été estimés après 6 semaines de culture. Chaque traitement a été répété trois fois, à raison de 50 plants par traitement.

**Acclimatation des plantules développées :** Pour le sevrage, les plantules avec un système racinaire bien développé ont été utilisées. Les racines ont été rincées à l'eau afin d'éliminer toute trace de milieu de culture. Ensuite les plants ont été transférés dans un premier temps dans des pots contenant du sable stérilisé. Les pots ont été placés dans le milieu naturel sous un abri recouvert d'un film en plastique transparent et contenant des mousses constamment humidifiées. Un

## RESULTATS

**Phase d'initiation des cultures :** Cette phase a eu pour but de sélectionner les explants viables, sains et appropriés pour induire la formation multiple de bourgeons. Les contaminations bactériennes et/ou fongiques et la nécrose des explants ont été les principaux facteurs limitant de cette phase.

Au cours de cette étape indispensable à la réussite de la culture, le brunissement des milieux de culture résultant de la sécrétion de composés phénoliques par les explants a aussi été observé. Les contaminations observées lors des cultures ont essentiellement été bactériennes. Le succès de cette phase a été apprécié par l'estimation des taux de contamination et de nécrose des explants. Les analyses statistiques réalisées ont révélé un effet cultivar et un effet état physiologique des explants ( $P=0,000356$ , Tableau 1) pour le taux de contamination. Le taux de contamination a aussi été influencé par l'interaction état x taille des explants ( $P=0,001838$ , Tableau 1).

arrosage régulier a été effectué à l'aide d'un pulvérisateur à fine gouttes. La température sous l'abri a été de 32 °C et l'humidité relative a varié de 70 à 80 %. Après 3 semaines, les plantules ayant émis une nouvelle feuille ont été transférées dans des sachets de dimensions 26,5 x 23,5 cm contenant un mélange de sable, de l'humus et couche arable du sol de forêt et de fiente de volaille dans les proportions 1 :2 :1 (v/v/v). Deux mois après le transfert, la réussite de la phase d'acclimatation a été appréciée par l'estimation du taux de survie des plants sevrés.

**Analyses statistiques :** Pour toutes les expériences réalisées, le logiciel STATISTICA 6.0 a été utilisé pour les analyses statistiques. Les tests d'homogénéités de variance à deux ou trois facteurs de classification ont été réalisés afin de savoir s'il y avait une différence entre les facteurs étudiés. Lorsqu'une différence a été observée, le test des rangs multiples de Newman-Keuls au seuil de 5 % a été réalisé pour séparer les moyennes.

L'analyse des résultats indiqués sur la Figure 1 a montré que quelque soit la taille de l'explant, la conservation a augmenté leur taux de contamination. Les explants de grande taille (1 x 0,5 cm) ont été les plus contaminés. Les taux de contamination les plus élevés ont été observés avec le cultivar Corne 1. Les explants issus de rejets non conservés ont présenté moins de contamination voire même aucune chez le cultivar Orishele lorsque la taille a été réduite (0,5 x 0,25 cm).

La nécrose des explants n'est pas liée au cultivar ( $P=0,536024$ , Tableau 1) mais plutôt à l'état des rejets (mode de conservation) et à la taille des explants ( $P=0,00159$ ). Les explants provenant de rejets conservés ont exprimé un taux de nécrose plus important que ceux issus de rejets non conservés. Les taux de nécroses ont statistiquement été identiques pour les explants issus de rejets non conservés quelque soit la taille de l'explant (Figure 2).

**Tableau 1 :** Niveau de probabilité (P) calculée pour les différents tests d'analyses pour chaque caractère étudié suivant la source de variation

Caractères	Source de variation						
	Cultivars (1)	Photopériode (2)	Vitamines (3)	Interaction (1-2)	Interaction (1-3)	Interaction (2-3)	Interaction (1-2-3)
Taux de Contamination	0,000356	0,000356*	0,846988*	0,341395	0,564512	0,001838	0,341395
Taux de Nécrose	0,536024	0,001590*	0,001590*	0,133410	0,755918	0,133410	0,536024

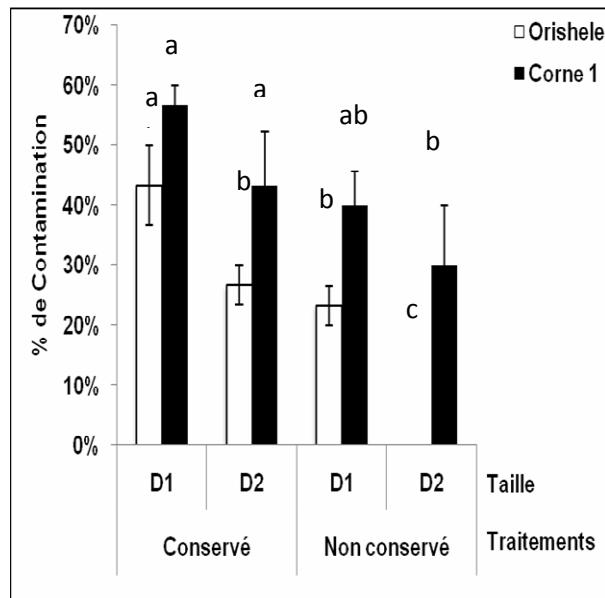
Temps de Latence	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,000723	0,626364	<0.0001	<0.0001
Nombre de bourgeons /explant	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,491000	0,491000	<0.0001	<0.0001
Taux d'enracinement	0,125176	0,075097	0,708406	0,925350	0,925350	0,007705	0,708406
Hauteur moyenne des plantules	0,002760	<0.0001	<0.0001	0,344059	0,000189	<0.0001	0,442741
Taux de survie	0,005397	0,625055	0,078471	0,716130	0,445632	0,227760	0,969968

\* : les valeurs de sources de variation sont obtenues pour l'état physiologique et la taille des explants pour les paramètres taux de contamination et de nécrose

**Phase de multiplication :** Le taux de régénération des bourgeons a été supérieur à 96 % dans nos conditions expérimentales pour tous les traitements. Il a varié de 99 à 100 % à l'obscurité (Tableau 3). L'analyse statistique a révélé une différence de réactivité dépendante du cultivar, de la photopériode et de la formulation vitaminique ( $P < 0,0001$ , Tableau 1). Sur tous les milieux de culture utilisés, l'apparition des bourgeons chez les cultivars a été observée dans un délai plus réduit en condition d'obscurité par rapport à la photopériode. Quelque soit la condition de culture

adoptée, les explants du cultivar Orishele ont induit plus facilement des bourgeons comparativement à ceux du cultivar Corne (Tableau 2).

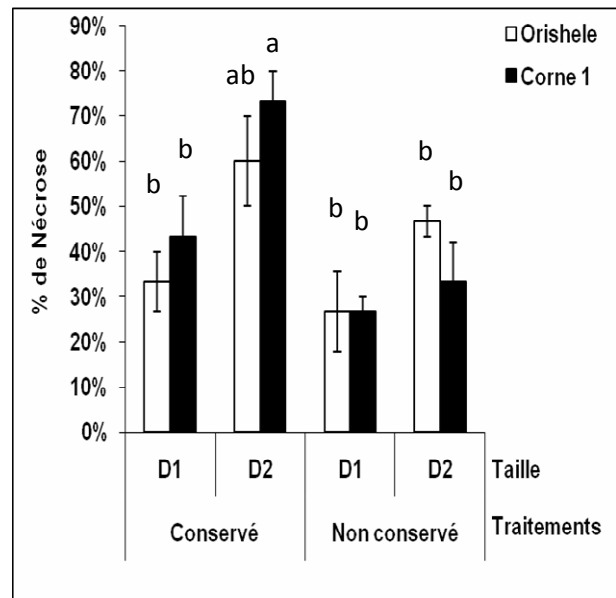
Les bourgeons formés en photopériode de 12 h sont pris en masse et donc difficilement individualisables contrairement aux bourgeons induits à l'obscurité. Cependant, les bourgeons développés à l'obscurité sont plus développés que ceux obtenus en photopériode de 12



**Figure 1**

**Figure 1 :** Effet des dimensions des explants et de l'état physiologique (traitements) des rejets sur le taux de contamination des explants des cultivars orishele et corne 1 à l'initiation

**Figure 2 :** Effet des dimensions des explants et de l'état physiologique (traitements) des rejets sur le taux



**Figure 2**

de nécrose des explants des cultivars orishele et corne 1 à l'initiation

**Legend :** D1=dimension 1x0,5 cm ; D2=dimension 0,5x0,25 cm ; Des lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil de 5 %, selon le test de Newman-Keuls. (Moyenne ± écart type)



**Tableau 2 :** Temps moyen (en jour) pour observer l'induction de bourgeons chez les cultivars Orishele et Corne 1 de bananier plantain sur les milieux de culture enrichis des formulations vitaminiques de MOREL et Murashige et Skoog en condition de 12h photopériode et d'obscurité continue.

Vitamines	Orishele		Corne 1	
	Obscurité	Photopériode	Obscurité	Photopériode
MOREL	11,96± 2,29 <sup>g</sup>	13,07 ± 1,68 <sup>f</sup>	16,36 ± 1,98 <sup>e</sup>	18,31 ± 3,21 <sup>d</sup>
MS	18,31±3,07 <sup>d</sup>	20,53 ± 2,46 <sup>c</sup>	21,6 ± 2,15 <sup>b</sup>	26,4 ± 1,72 <sup>a</sup>

Dans une même ligne et dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5%, selon le test de Newman-Keuls. (Moyenne ± écart type)

Les explants ont présenté des formations globulaires à leur base. Ces formations ont un aspect blanchâtres à l'obscurité et jaune verdâtre à la lumière.

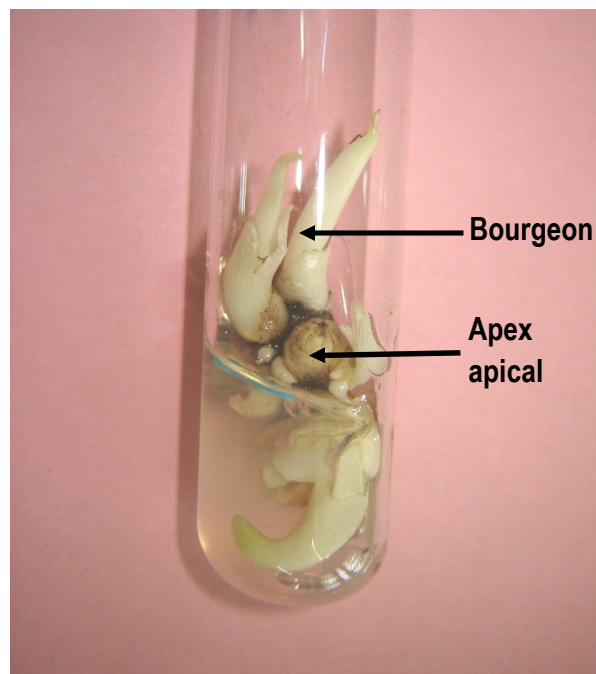
Deux types de bourgeons ont été induits. Le premier type de bourgeons (bourgeons axillaires) a été induit à la base des explants (Figure 3). Ces bourgeons ont une évolution rapide. Les second type, représentant les bourgeons adventifs ont été induits à l'extrémité des explants. De nombreux bourgeons à faible croissance apparaissent alors à la surface de l'explant (Figure 4). La fréquence d'induction des bourgeons axillaires a été de 65% chez le cultivar Corne 1 et de 20 % chez Orishele quelle que soit la formulation vitaminique pour des explants placés à l'obscurité. A la photopériode 12 h, il y a eu une forte induction de bourgeons axillaires dont 68 % pour Orishel et 66 % pour Corne 1.

Les analyses statistiques ont révélé des différences hautement significatives pour ce qui concerne l'effets cultivar, photopériode, vitamines, et les interactions photopériode x vitamines et les trois facteurs ( $P < 0,001$ , Tableau 1). Le résultat (Tableau 3) a montré que chez les deux cultivars Orishele et Corne 1, le nombre moyen de bourgeons a été élevé en présence des vitamines Morel en condition d'obscurité avec, respectivement,  $13,49 \pm 2,63$  et  $10,33 \pm 2,35$  bourgeons par explant. Sur le milieu enrichi avec les vitamines MS, le nombre moyen de bourgeon par explant du cultivar Orishele a été plus élevé sous la photopériode 12h. Toutefois, les analyses statistiques n'ont pas révélé de différence significative. Le cultivar Corne 1 donne de bon résultat à obscurité quelle que soit la formulation vitaminique utilisée avec un nombre moyen de bourgeons /explant de  $8,89 \pm 3,08$  en présence des vitamines MS et de  $10,33 \pm 2,35$  avec les vitamines de Morel (Tableau 3).

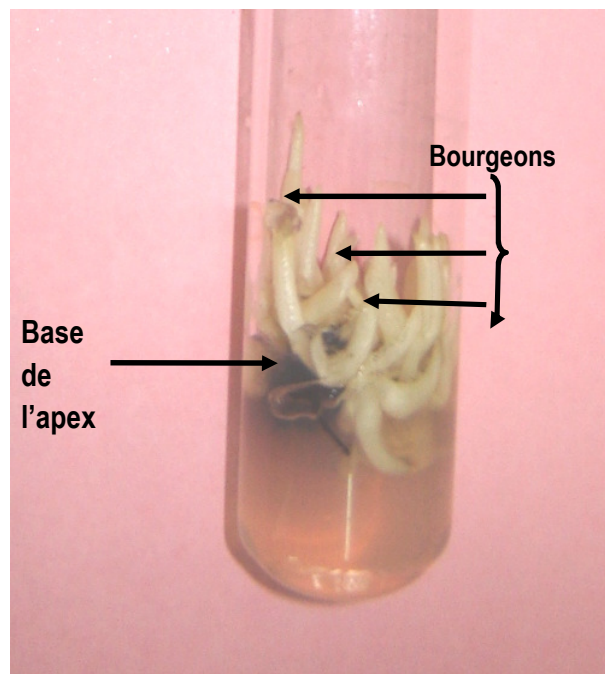
**Tableau 3 :** Régénération (%) et le nombre moyen de bourgeons / explant chez les cultivars Orishele et Corne 1 de bananier plantain, produits sur milieux de culture enrichis des formulations vitaminiques de MOREL et Murashige et Skoog en condition de 12h photopériode et d'obscurité continue.

Vitamines	Condition de culture	Orishele		Corne 1	
		% bourgeons	Nombre de bourgeon /explant	% bourgeons	Nombre de bourgeon /explant
MOREL	Photopériode	98	6,09 ± 1,61 <sup>de</sup>	97	6,75 ± 1,86 <sup>d</sup>
	Obscurité	100	13,49 ± 2,63 <sup>a</sup>	99	10,33 ± 2,35 <sup>b</sup>
MS	Photopériode	96	9,16 ± 2,72 <sup>c</sup>	98	5,27 ± 2,13 <sup>e</sup>
	Obscurité	100	8,22 ± 3,32 <sup>c</sup>	100	8,89 ± 3,08 <sup>c</sup>

Dans une même ligne et dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5%, selon le test de Newman-Keuls. (Moyenne ± écart type)



**Figure 3** : Formation de bourgeons axillaire chez le cultivar Orishele en condition d'obscurité continue.



**Figure 4** : Formation de bourgeons adventifs chez le cultivar Orishele en condition d'obscurité continue.

#### Enracinement et élongation des pousses feuillées :

Pour toutes les conditions de culture, les taux d'enracinement ont été supérieurs à 50 % (Tableau 4). Les taux d'enracinement ont varié de 55 à 78 % pour les vitamines de MS et de 63 à 73 % pour Morel. Aucune différence statistique n'a été observée entre ces valeurs. Toutefois, les meilleurs taux d'enracinement observés sont  $78 \pm 07$  % et  $71 \pm 03$  % respectivement chez Orishele et Corne 1, sur les milieux enrichis avec les vitamines MS après 2 semaines à l'obscurité. Lorsque l'enracinement a été effectué sur le milieu enrichi des vitamines Morel, le

taux d'enracinement a été élevé en photopériode 12 h avec les taux de  $73 \pm 16$  % et  $66 \pm 08$  %, respectivement, chez Orishele et Corne 1.

Les hauteurs des plants pour tous les traitements ont été significativement différents ( $P < 5\%$ , Tableau 5). Les plantules de grande tailles ont été observées sur les milieux enrichis avec les vitamines MS quelque soit le cultivar et le mode d'éclairage. Cependant, la taille des plantules a été plus importante lorsqu'elles ont séjourné deux semaines à l'obscurité avant d'être transférées sous la photopériode 12 h.

**Tableau 4** : Effet des formulations vitaminiques de MOREL et Murashige et Skoog sur le pourcentage (%) d'enracinement des bourgeons chez les cultivars Orishele et de Corne 1 (*Musa AAB*) après 45 jours de culture

Vitamines	Orishele		Corne 1	
	2 Semaines Obscurité + Photopériode	Photopériode	2 Semaines Obscurité + Photopériode	Photopériode
MOREL	$68 \pm 02$ <sup>a</sup>	$73 \pm 16$ <sup>a</sup>	$63 \pm 05$ <sup>a</sup>	$66 \pm 08$ <sup>a</sup>
MS	$78 \pm 07$ <sup>a</sup>	$59 \pm 11$ <sup>a</sup>	$71 \pm 03$ <sup>a</sup>	$55 \pm 08$ <sup>a</sup>

Dans une même ligne et dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre indiquent qu'il n'y a pas de différence significative au seuil de 5 %, selon le test de Newman-Keuls. (Moyenne  $\pm$  écart type)

**Tableau 5 :** Effet des formulations vitaminiques de MOREL et Murashige et Skoog sur la hauteur (en cm) des plantules des deux cultivars Orishele et Corne 1 de bananier plantain, 45 jours après enracinement.

Vitamines	Orishele		Corne 1	
	2 Semaines Obscurité + Photopériode	Photopériode	2 Semaines Obscurité + Photopériode	Photopériode
MOREL	1,94 ± 0,73 <sup>c</sup>	1,95 ± 0,80 <sup>c</sup>	1,91 ± 0,71 <sup>c</sup>	1,89 ± 1,01 <sup>c</sup>
MS	3,27 ± 0,91 <sup>a</sup>	2,62 ± 1,22 <sup>b</sup>	3,79 ± 0,82 <sup>a</sup>	2,93 ± 0,60 <sup>b</sup>

Dans une même ligne et dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5%, selon le test de Newman-Keuls. (Moyenne ± écart type)

**Acclimatation des plantules régénérées :** Le taux de survie des plantules a été déterminé lorsque les plants ont été transférés au champ. Les taux de survie des plants enracinés deux mois après sevrage n'ont pas présenté de différences significatives (Tableau 6). Ces

taux ont variés de 44 à 62 %. Le taux le plus élevé (62 %) a été observé avec le cultivar Orishele à partir de bourgeons développés sur milieu enrichi avec les vitamines MS.

**Tableau 6:** Taux (%) de survie des plants des deux cultivars Orishele et Corne 1 de bananier plantain enracinés deux mois après sevrage.

Vitamines	Orishele		Corne 1	
	2 Semaines d'obscurité + Photopériode	Photopériode	2 Semaines d'obscurité + Photopériode	Photopériode
MOREL	55 ± 14 <sup>a</sup>	59 ± 11 <sup>a</sup>	44 ± 08 <sup>a</sup>	45 ± 06 <sup>a</sup>
MS	62 ± 14 <sup>a</sup>	58 ± 12 <sup>a</sup>	57 ± 12 <sup>a</sup>	50 ± 10 <sup>a</sup>

Dans une même ligne et dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre indiquent qu'il n'y a pas de différence significative au seuil de 5 %, selon le test de Newman-Keuls. (Moyenne ± écart type)

## DISCUSSION

L'utilisation d'explants de grandes dimensions issus de rejets conservés a entraîné un taux de contamination élevé. En culture *in vitro* du bananier, la taille des apex utilisés peut varier de 0,1 à 10 mm (Jones, 1987 ; López-Aranda *et al.* 1994 ; Nehra *et al.*, 1994). Youmbi & Ngaha (2004) ont utilisé des explants de taille 1 x 0,8 cm. Ils ont obtenu des taux d'infection de l'ordre de 30%. Ces auteurs ont suggéré que les faibles taux d'infections seraient dus à la petite taille des explants ensemencés. Ce résultat est similaire à nos observations. De même, Boxus (1977) a montré que les plantes cryoconservées exprimaient un taux élevé d'infections internes. De plus, Mc Grew (1980) a remarqué des différences dans les niveaux de contamination en fonction des variétés et de la saison de l'année à laquelle a lieu le prélèvement des apex.

Nos résultats suggèrent que les infections internes du matériel ne pourraient être éliminées par stérilisation superficielle. Toutefois, une stérilisation en profondeur aurait pour conséquence la destruction du méristème et donc la mort de l'explant. Pierik (1987) a

préconisé l'utilisation de culture de méristèmes et l'ajout d'antibiotiques au milieu comme étant deux techniques efficaces. Le taux élevé de contamination des explants issus de rejets conservés serait dû au fait que les bactéries pénétreraient dans les interstices des cellules à la recherche de condition d'humidité favorable à leur prolifération et à la recherche de nutriment. Ce taux serait également dû à la sensibilité du cultivar corne 1 aux parasites bactérien du sol. Les rejets conservés mettraient en place des mécanismes de mobilisation des composés secondaires tels que les phénols qui assureraient leur protection.

La nécrose des explants constitue dès lors une entrave majeure dans la réussite de la culture *in vitro* du bananier plantain. Le taux de nécrose des explants de petite taille est élevé. Cette nécrose serait due à la production des produits d'oxydation phénoliques. Ces composés produits dans les tissus blessés ou agressés vont déverser leurs contenus phénoliques dans le milieu de culture (Gupta, 1986 et Foyer *et al.* 1994). Ceux-ci vont s'oxyder et produire des



composés bruns. Ces composés envahissent rapidement l'explant de petite taille qui s'asphyxie et se nécrose. Les explants de grande taille n'auront pas toutes leurs cellules envahies, et pourront cependant développer des mécanismes qui leur permettraient de résister à la présence de ces produits indésirables.

Les réponses à l'organogénèse des explants de Orishélé et de Corne 1 ont été évaluées au cours de la phase de prolifération. Le temps mis pour l'induction des bourgeons diffère selon les cultivars. Il a été plus court pour le cultivar Orishélé que pour le cultivar Corne 1. Ces observations supposeraient un effet cultivar.

La présence de ces deux types de bourgeons a été observée chez ces deux cultivars de génotype AAB. Ces résultats ont déjà été observés par Banerjee & De Langhe (1985); Novack *et al.* (1990) et Kwa (1993). Ces auteurs ont attribué l'existence des bourgeons adventifs au génome B (*balbisan*). La prolifération chez Orishele à l'obscurité a été caractérisée par une forte proportion de bourgeons adventifs.

Les globules ronds, de structures blanchâtres (à l'obscurité) et jaune verdâtre (à la lumière) ont déjà été décrits par Vuylsteke & De Langhe (1984). Les bourgeons axillaires ont été observés à la base de l'explant initial au détriment des bourgeons adventifs. Selon Kaw (1993), les différences observées sur un même type d'explant seraient liées au site de formation du bourgeon d'une part, à l'exploitation variable de leurs potentialités morphogénétiques en culture *in vitro*, plus précisément à l'AGMA (Activité Globale du Méristème Apical) ou à l'absence d'une synchronisation de ce processus, d'autre part.

Cependant, la formation des bourgeons, solliciterait deux champs morphogénétiques. Il existerait alors, suivant les variétés, un champ internodal (au niveau du " V " former par les marges d'une gaine foliaire) et un champ nodal (à l'intérieur ou sur toute la largeur du nœud d'une feuille axillaire). Ces champs sont latents ou actifs pendant la vie de la plante et selon les variétés (Kwa, 1993). Hamilton (1965), Zryd *et al.* (1989) et Domergue (1990) ont montré que la formation des bourgeons adventifs a été observée suite à des traumatismes (blessure ou sections) intervenus au niveau d'un champ morphogène. La formation des deux types de bourgeons a été observée chez ces deux cultivars mais préférentiellement, les bourgeons adventifs ont été observés chez Corne 1. Ce résultat a déjà été rapporté par Kwa (1990) chez les Faux corne et Corne. Les sites morphogènes de formation des bourgeons seraient

activés ou mis en dormance selon que l'explant soit ou non dans des conditions favorables qui pourraient déclencher la formation des bourgeons.

Le nombre moyen de pousses par explant dépendrait non seulement des formulations vitaminiques auquel les explants ont été soumis, mais aussi de la photopériode. La production efficiente de pousses *in vitro* a fait l'objet de nombreuses études chez les monocotylédones et les dicotylédones (Konan *et al.*, 1997 ; Srivatanakul *et al.*, 2000 ; Sticklen & Oraby, 2005). Toute fois, tous les systèmes de régénération semblent avoir en commun une première période de prolifération des méristèmes axillaires qui est caractérisée par un taux relativement faible de multiplication de pousses. L'apparition des pousses adventives est précédée par l'augmentation des dômes méristématique mis en culture. Cependant, quelques génotypes ou même espèces ne peuvent pas surmonter cette période initiale de la multiplication plutôt lente et semble être récalcitrante pour la formation adventive de pousses dans les conditions *in vitro* (Gomes & Canhoto, 2003 ; Monteuis, 2004). Nos résultats sont contraires à ceux de Strosse *et al.* (2008) qui ont montré que *Musa* a été extrêmement récalcitrante à la formation adventive de pousse. Nous attribuons ce fait à la variété et aux différentes conditions de la culture. L'obscurité limite l'oxydation des composés phénoliques et optimise l'expression des phytohormones. Ceci impliquerait que l'obscurité réduirait la dominance apicale de la pousse primaire et favoriserait par conséquent la prolifération du tissu méristématique.

Une première indication soutenant cette hypothèse a été le taux relativement faible de multiplication et la présence de composés phénoliques remarquable lorsque les explants ont été incubés en photopériode 12 h. Deuxièmement, le nombre moyen de pousses par explant a généralement été deux à trois fois plus élevé quand les explants ont été inoculés sur un milieu enrichi avec les vitamines Morel et placé à l'obscurité. Troisièmement, le temps mis par les explants sur les milieux de multiplication aurait favorisé la différenciation des tissus qui a conduit à la formation de bourgeons adventifs.

Selon Strosse *et al.* (2008), la détermination de l'origine axillaire et/ou adventive aux endroits prédéterminés des bourgeons initiaux serait une indication importante selon les applications. La propagation à partir de bourgeons axillaire (même si elle ne donne pas des taux élevées pour certains cultivars) est avantageux afin de réduire les risques de

variation somaclonale (George, 1993). En revanche, le déclenchement de la formation adventive de pousses pourrait améliorer de manière significative l'efficacité de transformation (Zhang *et al.*, 1999). Le fait que les cultivars de bananier se composent de tissus meristematiques moins homogènes que chez certaines céréales pourrait expliquer l'origine différente des pousses multiples chez les plantes (Strosse *et al.* 2008).

Le taux d'enracinement a été élevé sur les milieux enrichis avec les vitamines MS et placé 2 semaines à l'obscurité avant de subir une photopériode de 12 h, mais il n'atteignant pas les 80 % d'enracinement. Il faut cependant remarquer que l'apparition des racines est rapide à l'obscurité. Toute fois, la qualité des pousses est affectée par l'obscurité en raison de leur étiolement. Ce qui est réversible dès le passage en photopériode 12 h. Le passage à deux semaines d'obscurité permettrait l'initiation rapide des racines. Il apparait donc que l'auxine endogène produit par la plante pourrait être plus active lorsque les plantules séjournent à l'obscurité. Le facteur limitant de l'enracinement serait la lumière (Mateille & Foncelle, 1989) en l'absence d'auxine exogène. Ces auteurs ont également montré que l'obscurité permettait une meilleure qualité de l'enracinement.

Cependant, le charbon actif, connu pour ses effets adsorbants des régulateurs de croissance *in vitro* (Wheatherhead *et al.*, 1979), diminuerait la survie des

explants tout en augmentant leur taux d'enracinement (Gübbük & Pekmezci, 2004). L'allongement des plantules est aussi favorisé d'une part par le séjour des plants à l'obscurité et la couleur sombre du charbon actif mais aussi par les vitamines de MS. Mateille & Foncelle (1988) ont montré que lorsque les fonds des tubes de culture contenant le milieu de culture sont placés à l'obscurité, les bourgeons ont eu les meilleurs taux d'enracinement.

Deux semaines après le transfert des plants, leur capacité d'adaptation a été estimée par la détermination du taux de survie. Les valeurs expérimentales obtenues n'ont pas montré de différences quelque soit la formulation vitaminique ou la photopériode utilisée. Cette similitude serait due au fait que les écarts entre les valeurs sont tellement importante qu'ils n'ont pas permis d'observer des différences. Ces faibles taux seraient favorisés par l'insuffisance nutritionnelle au cours du sevrage. Selon Martin-Prevel & Charpentier (1963), la nutrition du bananier pendant le sevrage est très importante et devrait être estimée par rapport aux besoins du bananier adulte. Les apports devraient être en moyenne, de 10 à 20 fois supérieurs aux besoins de la plante adulte. Toutefois, le cultivar Orishele a montré le taux de survit le plus élevé sur les milieux riches en vitamines MS. Les vitamines MS seraient favorables au développement des plants de bananier plantain *in vitro* au cours de la phase de croissance

## CONCLUSION

La culture *in vitro* de bananier plantain reste un challenge pour les pays tropicaux en développement où le problème de la sécurité alimentaire se pose avec acuité. Les rejets de rang 1 immédiatement utilisés après récolte éviteraient des taux élevés de perte lors de l'initiation des cultures. Au cours de la phase de multiplication, les explants doivent être ensemencés

sur un milieu enrichi des vitamines de Morel. Les milieux ensemencés devront être incubés en salle de culture à obscurité continue et la température fixée à  $25 \pm 2$  °C. Les bourgeons sont placés sur milieu enrichi des vitamines MS contenant du charbon actif et dépourvu de régulateur de croissance pour assurer l'enracinement

## REFERENCES

- Adelaja BA, 1995. Rapid on-farm multiplication technique for plantain and banana. *MusAfrica* 8 : 6.
- Afza R, Van Duren M, Morpurgo R, Novak FJ, 1996. Banana tissue culture and its prospective use in developing countries. Pp. 58-70 *in* Plant Tissue Culture (A.S. Islam, ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi/ Calcutta.
- ANADER, 2009 : Le Partenaire: la production vivrière : un enjeu national. Bulletin de liaison de l'agence nationale de développement rural N° 14 ; 12p.
- Assani A, Haïcour R, Wengel G, Foroughi-Wehr B, Bakry F, Côte FX, Ducreux G, Ambroise A, Grapin A, 2002. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.) *Plant Science* 162:355-362.
- Banerjee N. and De Langhe E, 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of

- Musa* (banana and plantain). Plant Cell Report. 4: 351–354.
- Boxus P, 1977. La "micropropagation", procédé industriel de multiplication rapide du fraisier. - Fruit Belge 378 : 120-128.
- Domergue R, 1990. Contribution à l'amélioration de la micropropagation du bananier plantain, Université Montpellier II, Mémoire de DESS, Montpellier, France, 72p.
- Etienne H. and Berthouly M, 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215-231.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ 1994. Photooxidative stress in plants, Physiol. Plant 92 : 696-717.
- Ganapathi TR, Mohan JSS, Suprasanna P, Bapat VA, Rao PS, 1995. A low-cost strategy for *in vitro* propagation of banana. Current Science 68 : 646-649.
- George EF, 1993. Plant propagation by tissue culture- Part 1: the technology. Exegetics Ltd, Edington, UK, p 574
- Gomes F. and Canhoto JM, 2003. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:316–321.
- Gupta PP. 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of banana and plantain through meristem tip culture. Plant Cell Tissue Organ Culture, 6. 336-339.
- Gübbük H. and Pekmezci M, 2004. *In Vitro* Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.), Turk J Agric For 28: 355-361.
- Hamilton KS, 1965. Reproduction of banana from adventitious buds. Tropical Agriculture (Trinidad) 42 (1):69-73.
- Jones OP, 1987. Micropropagation of strawberry and temperate fruit trees. - In *Micropropagation in horticulture: Practice and commercial problems*. - Proc. Inst. Hortic. Symp. University of Nottingham School of Agriculture, p 85-96.
- Jones DR, 2000. Diseases of Banana, Abaca and Enset, CABI Publishing, CAB International, Rayane-uni.544p.
- Konan NK, Schöpke C, Cárcamo R, Beachy RN, Fauquet C, 1997. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. Plant Cell Rep 16: 444–449.
- Kwa M, 1990. Comparaison du développement morphogénétique de bananiers issus de graines, d'embryons zygotiques et de culture d'apex *in vitro*, Mémoire de DEA, Université de Montpellier II, France, 35p.
- Kwa M, 1993. Architecture, morphogénèse et anatomie de quelques cultivars de bananiers, université Montpellier II, Thèse, Montpellier, France, 286p.
- López-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, López-Navidad I, Barceló- Muñoz M, 1994. Micropropagation of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. - *J. Hortic. Sci.*, 69(4), 625-637.
- Lorenzo JC, Gonzales BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C, 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell, Tissue Organ Culture 54(3):197-200.
- Madhulatha P, Kirubakaran SI, Sakthivel N, 2006. Effects of carbon sources and auxins on *in vitro* propagation of banana. *Biologia Plantarum* 50(4):782-784.
- Martin-Prevel P. and Charpentier JM, 1963. Symptômes de carences en éléments minéraux chez le bananier. *Fruits*. 18 (5) : 221-247.
- Mateille T. and Foncelle B, 1988. Micropropagation of *Musa* AAA cv. Poyo in the Ivory Coast. *Trop. Agric. (Trinidad)* 65(4) :325-328.
- Matsumoto K. and Kaizer Brandão AC, 2002. Comparaison des systèmes d'immersion temporaire et permanente pour la culture *in vitro* du bananier. *Info Musa* 11 (2) : 36-37.
- Mbanaso ENA, Crouch J, Onofeghara F, 2006. Effet de fragmentation et de l'incision sur la culture d'apex de différents génotypes de bananiers à cuire. *Info Musa* 15(1-2):30-32.
- Mc Grew JR, 1980. Meristem culture for production of virus-free strawberries. - Proceeding on the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture. Application and feasibility. Beltsville, Maryland, 80-85.
- Michael WB, Catherine WF, Van Staden J, 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in cavendish banana (*Musa* AAA cv. "zelig"), *Scientia Horticulturae* 108:347-351.



- Monteuuis O, 2004. *In vitro* micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:102–107.
- Morel G, 1950. Sur la culture des tissus de deux monocotylédones – C.R. Acad. Sc. Paris, 230, 1099-1101.
- Murashige T. and Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*15: 473–497.
- Nehra NS, Kartha KK, Stushnoff C, Giles K.L, 1994. Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. - *Euphytica*, 76(1-2), 107-115.
- Nkendah R and Akyeampong E, 2003. Données socioéconomiques sur la filière plantain en Afrique Centrale et de l'Ouest *InfoMusa*. 12(1) : 8-13.
- Novak FJ, Afza R, Van Duren M, Omar MS, 1990. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (*Musa cvs*). *Trop. Agric. (Trinidad)* 67:21-28.
- Pierik RLM, 1987. Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. - In Debergh (P.C.), Zimmerman (R.H.) *Micropropagation. Technology and application*. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 155-165.
- Srivatanakul M, Park SH, Sanders JR, Salas MG, Smith RH, 2000. Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. *Plant Cell Rep.* 19:1165–1170.
- Sticklen MB. and Oraby HF, 2005. Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:187–200.
- Strosse H, Andre E, Sági L, Swennen R, Panis B, 2008. Adventitious shoot formation is not inherent to micropropagation of banana as it is in maize. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 95:321–332.
- Strosse H, Schoofs H, Panis B, Andre E, Reyniers K, Swennen R, 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa spp.*). *Plant Sci* 170:104–112.
- Vuylsteke DR, 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm, *Practical manuals for* handing crop germoplasm *in vitro*. Int. Board Plant Genet. Resour. (IBPGR), Rome, Italy, 55p.
- Vuylsteke D. and De Langhe E, 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Trop. Agric. (Trinidad)*. 62(4): 323-328.
- Wheatherhead MA, Burwn J, Henshaw GG, 1979. Effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media : Part. II – Z. *Pflanzenphysiol.* 94 : 399-405.
- Yombi E. and Ngaha D, 2004. Expression *in vitro* des capacités organogènes des bourgeons axillaires chez le bananier plantain (*Musa spp.*) *Fruits* 59(4) :241-248.
- Zhang S, Cho MJ, Koprek T, Yun R, Bregitzer P, Lemaux PG, 1999. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Rep.* 18:959–966.
- Zryd JP, 1989. Culture de cellules, tissus et organes végétaux : Fondements théoriques et utilisations pratiques. Ed. Presses Polytechniques Romandes 305p.