



Effets du charbon actif dans le milieu de culture sur l'induction de la rhizogénèse chez l'hybride FHIA-01 de bananier (*Musa AAAB*) en culture *in vitro*

Mazinga Kwey Michel^{(a)*}, Mario Godoy Jara^(b), Van Koninckxloo Michel^(c), Nyembo Kimuni Luciens^(d), Kasongo Lenge Mukonzo Emery^(e), Ntumba Katombe Becker^f, Baboy Longanza Louis^{(d)&(g)},

^(a)Laboratoire de culture *in vitro* des plantes, Département de phytotechnie, Faculté des sciences agronomiques, Université de Lubumbashi B.P 1825 Lubumbashi, RD Congo.

^(b)Haute École Provinciale du Hainaut Occidentale-Condorcet et laboratoire de culture *in vitro* du centre de Recherches « Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la Province de Hainaut » (CARAH asbl), rue Paul Pastur 11, 7800 ATH/Belgique ;

^(c)Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la Province de Hainaut (CARAH asbl) et Inspection générale de l'enseignement supérieur de la Province de Hainaut. , rue Paul Pasteur 11, 7800 ATH/Belgique.

^(d)Département de phytotechnie, Faculté des sciences agronomiques, Université de Lubumbashi B.P 1825 Lubumbashi, RD Congo ;

^(e)Département de Gestion des ressources naturelles renouvelables, Faculté des sciences agronomiques, Université de Lubumbashi B.P 1825 Lubumbashi, RD Congo ;

^(f)Section Gestion de l'eau et fertilité du sol, Antenne Gestion des Ressources Naturelles, Institut National pour l'Etude et la Recherche Agronomiques, Station de Kipopo, RD Congo BP 224 ;

^(g)Collaborateur Scientifique au Service d'Écologie du Paysage et Systèmes de Production Végétale, à l'Université Libre de Bruxelles, Avenue F.D. Roosevelt 50, CP 169 B-1050 Bruxelles, Belgique ;

*Auteur correspondant : E-mail : michelmaz2003@yahoo.fr Tél : +243970648542

Original submitted in on 7th November 2013. Published online at www.m.elewa.org on 30th April 2014. <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v76i1.6>

RÉSUMÉ

Objectifs : En culture *in vitro*, le charbon actif est utilisé pour son rôle d'antioxydant. Il est devenu une nécessité pour régler le problème d'oxydation qui est particulièrement épineux lors de la phase d'initiation de culture, où une oxydation rapide des méristèmes mises en incubation sur le milieu d'initiation est constatée. Dans cette étude, l'objectif était de comparer les effets des différentes concentrations du charbon actif en présence des phytohormones (auxine, cytokinines) sur l'induction de la rhizogénèse de racines FHIA-01 au cours de la phase d'enracinement *in vitro*.

Méthodologie et résultats : Les explants utilisés proviennent du cultivar FHIA-01, constitués par des vitroplants issus des bourgeons apicaux et axillaires. Quatre traitements ont été appliqués : Traitement 1 (sans charbon actif), Traitement 2 (0,25 % Charbon actif) ; Traitement 3 (0,50 % Charbon actif) ; Traitement 4 (1,00 % Charbon actif). Le milieu de base était constitué de MS ; 4,405 mg.l⁻¹, additionnés des phytohormones ; 20 µM mT, 1 µM. AIA, du saccharose 20 g.l⁻¹ et de l'Agar 7 g.l⁻¹. La réponse des

traitements étudiés de par les observations faites sur le nombre de racines formées par explant indique que les concentrations en charbon actif de 0,25 % et 1,00 % incorporées dans le milieu de culture de base sont nettement meilleures comparativement aux autres traitements (sans charbon actif, 0,50 %). *Conclusion et application de la recherche* : L'ajout du charbon actif est bénéfique pour le développement du système racinaire et de l'organogénèse. Ces résultats constituent une alternative à l'intensification de la culture de bananiers dans les grandes exploitations agricoles, où la faible disponibilité de matériels de plantation constitue une contrainte majeure.

Mots clés : Charbon actif, phytohormones, culture *in vitro*, explants, bananier, FHIA-01

Abstract

Effects of activated charcoal in the rooting culture medium on the induction of FHIA -01 (Musa AAAB) *in vitro*

Objectives: In tissue culture, activated carbon as an antioxidant. It has become a necessary to control oxidation in the initiation phase where rapid oxidation of incubated meristems has been observed. In this study, the objective was to compare the effects of different concentrations of activated carbon in the presence of phytohormones (auxin, cytokinins) on the induction of rooting roots FHIA-01 during the *in vitro* rooting phase.

Methods and results: The explants used were from cultivar FHIA -01, consisting of plantlets from apical and axillary buds. Four treatments were applied: Treatment 1 (without charcoal), Treatment 2 (0.25% activated carbon), Treatment 3 (0.50% activated carbon), Treatment 4 (1.00% activated carbon). The basal medium consisted of MS 4,405 mg.l⁻¹, added phytohormones (20 mT microM, 1 microM.AIA, 20 g.l⁻¹ of sucrose and 7 g.l⁻¹ of agar). The response of the studied treatments indicates, by observations on the number of roots formed per explants, that the concentrations of activated carbon of 0.25 % and 1.00% embedded in the culture medium base are much better compared to other treatments (without activated carbon , 0.50 %).

Conclusion and implementation of the research: The addition of activated charcoal is beneficial for root development and organogenesis. These results provide an alternative to intensive cultivation of banana in large farms, where the limited availability of planting material is a major constraint.

Keywords: Activated charcoal, phytohormones, *in vitro* culture, explants, banana FHIA-01

INTRODUCTION

Dans la nature, le charbon actif intervient lors du passage de feu en forêt comme en brousse, sur le substrat de germination. Son effet absorbant sur les composés phénoliques qui inhibe la germination et la croissance (Naydenov et al., 2006). En culture *in vitro*, le charbon actif est utilisé pour son rôle d'antioxydant. Il est devenu une nécessité pour régler le problème d'oxydation qui est particulièrement épineux lors de la phase d'initiation de culture, où une oxydation rapide des méristèmes mises en incubation sur le milieu d'initiation est constatée. La présence des substances brunâtres est associée à une forte inhibition de la division des microspores et entraîne au bout d'un certain temps la nécrose des anthères (Reuveni et al., 1972 ; Reuveni et Kipnis,

1974 ; Chaibi et al., 2002) et en culture *in vitro* du Palmier dattier (Daguin et Letouze, 1989). La culture *in vitro* de bananier souffre souvent des noircissements provoqués par l'oxydation de composés polyphénoliques libérés par les tissus blessés lors de manipulations. Ces exsudats indésirables forment une barrière autour du tissu, ce qui empêche l'absorption de nutriments et entrave la croissance (Panis, 2009). En culture *in vitro* du bananier, Kone et al. (2010) ont utilisé le charbon actif (2 g/l) pour lutter contre le phénomène d'oxydation de milieu de culture. Par ailleurs d'autres chercheurs ont utilisé avec succès le charbon actif pour lutter contre le brunissement (Tisseart et al., 1979; Letouze et Daguin, 1988 ; Ben Abdallah, 1989). Le charbon actif est

également utilisé pour réduire la durée de la phase d'enracinement (Damiano, 1978; Damiano 1980; Kyte 1983; Boxus et al., 1984; Desjardins et al., 1987). Une faible prolifération racinaire peut avoir comme origine, la production par l'explant ; ou la présence dans le milieu de base, des substances chimiques inhibitrices de la morphogénèse. Ce phénomène est réduit par l'ajout du charbon actif qui exerce son effet par l'absorption des substances toxiques produites et rejetées par l'explant dans le milieu (Benderradji et al., 2007). La production de telles substances a été démontrée dans la culture *in vitro* de l'*Allium* et *Daucus* (Grant et Hammatt, 1999). Un autre effet est que le charbon absorbe les substances nocives associées aux minéraux entrant dans la

composition du milieu de culture (Benderradji et al., 2007). Sanchez et al. (1996) rapportent que l'ajout du charbon actif est bénéfique pour le développement du système racinaire et de l'organogénèse. L'effet du charbon est similaire à celui de l'obscurité car ce dernier noircit le milieu. Les effets stimulateurs du charbon actif, en culture *in vitro*, ont été rapportés par Rugini et al. (1988) pour l'olivier et par Rugini et al. (1993) pour l'amandier et le noyer. Dans cette étude, l'objectif était de comparer les effets des différentes concentrations du charbon actif en présence des phytohormones (auxine, cytokinines) sur l'induction de la rhizogénèse de racines FHIA-01 au cours de la phase d'enracinement *in vitro*.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'essai a été réalisé au laboratoire de culture *in vitro* du CARAH de l'H.E.P.H.O Condorcet à Ath (Belgique). Les explants de l'hybride FHIA-01 provenant de la phase de prolifération réalisée au laboratoire de culture *in vitro* du CARAH à l'H.E.P.H-Condorcet à Ath, ont été utilisés comme matériel biologique. Il s'agit des explants provenant du cultivar FHIA-01, constitués par des vitroplants issus des bourgeons apicaux et axillaires dont la taille était réduite à 2 cm de hauteur et 0,5 cm de diamètre. Le milieu de base utilisé est constitué de sels minéraux et de vitamines de (Murashige & Skoog, 1962) additionné de deux cytokinines dont 10 µM de BAP, 10 µM MemTR, d'une auxine AIA 1µM. et de saccharose à 20 g.l⁻¹. Le pH est ajusté à 5,8. Le milieu de culture est solidifié à l'agar 7 g.l⁻¹. Les essais ont été placés à la lumière à 27°C de température, une photopériode de 16 h. Cinq (5)

explants par répétition ont été incubés. Un total de 10 répétitions par traitement a été effectué. Les récipients utilisés sont les bacs en plastique munis du filtre d'aération sur le couvercle. Il a été garni de 100 ml de milieu de culture par bac. La durée de chaque essai était de 45 jours. Les quatre milieux de cultures ayant des concentrations variées de charbon actif constituant les différents traitements pour le premier essai ont été testés : Traitement 1 (sans charbon actif), Traitement 2 (0,25 % Charbon actif); Traitement 3 (0,50 % Charbon actif); Traitement 4 (1,00 % Charbon actif). Les observations sur le nombre de racines formées, le nombre de feuilles émises, la taille de l'explant initial et le nombre de bourgeons proliférés ont été estimés après 6 semaines de culture comme décrit par Kone et al. (2010). Les résultats ont été soumis aux analyses statistiques (ANOVA) avec le logiciel SPSS.

RÉSULTATS

Le nombre de racines a varié significativement entre les différents traitements au charbon actif. L'enracinement augmente pour des concentrations comprises entre 0,50 % et 0,25 % et supérieures à 0,50

% de charbon actif ($p < 0,05$). Les valeurs moyennes étaient respectivement de $5,6 \pm 1,3$ (a), $3,8 \pm 1,9$ (b), $5,2 \pm 1,4$ (ab) respectivement pour 0,25 %, 0,50 %, 1,00 % et le contrôle $3,2 \pm 1,7$ (b) (Figure 1).

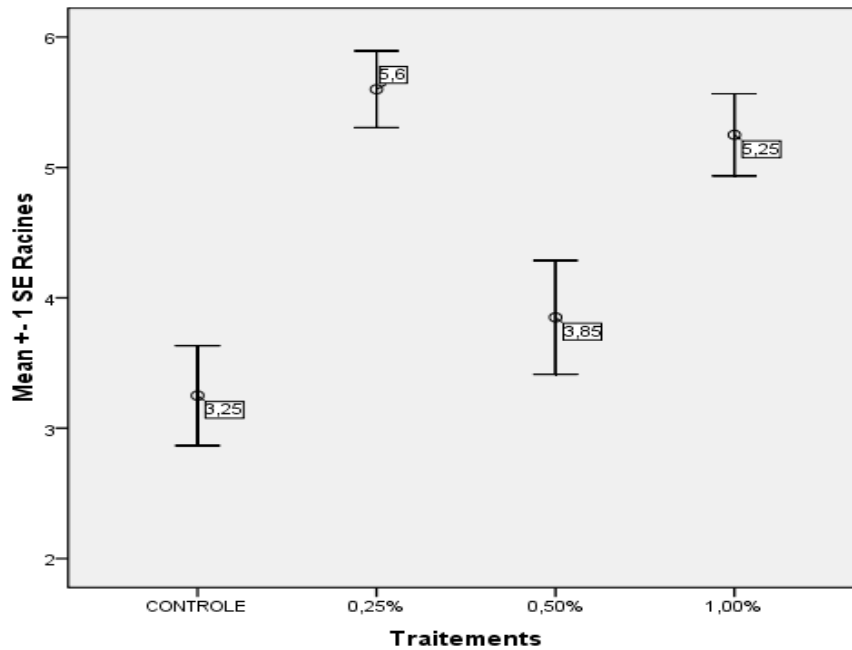


Figure 1. Effet des concentrations croissantes de charbon actif sur la rhizogénèse.

Les différents traitements au charbon actif ont montré une performance, la prolifération de bourgeons moins bonne comparativement au contrôle ($p < 0,01$). Les valeurs moyennes étaient respectivement de $0,1 \pm 0,44$

(b), $0,15 \pm 0,36$ (ab), $1 \pm 0,4$ (b) respectivement pour 0,25 %, 0,50 %, 1,00 % et le contrôle $0,7 \pm 1,7$ (a) (Figure 2).

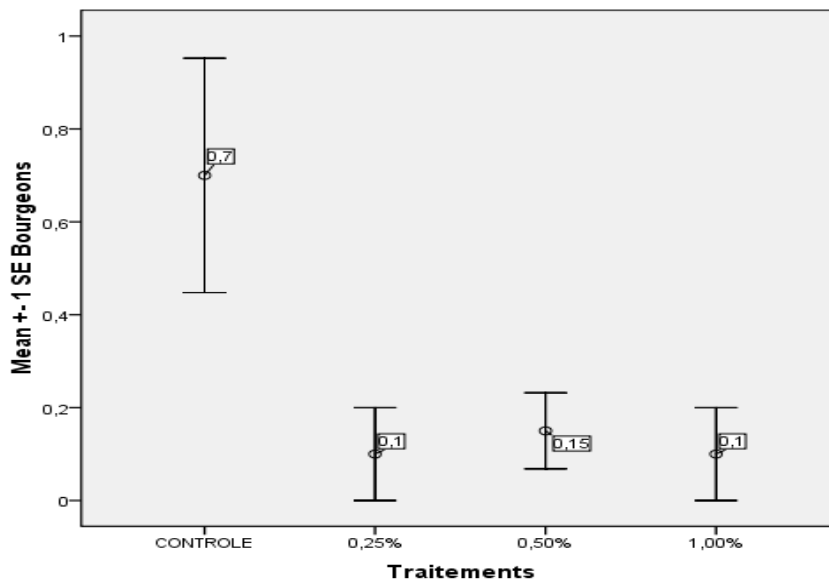


Figure 2. Effet des concentrations croissantes de charbon actif sur l'induction de bourgeons.

Le traitement contenant la concentration 1,00 % de charbon actif a favorisé l'augmentation de la taille

d'explant comparativement aux trois autres 0,25 % et 0,50 % ($p < 0,05$). Les valeurs moyennes étaient

Mazinga et al. J. Appl. Biosci. 2014. Effets du charbon actif dans le milieu de culture sur l'induction de la rhizogénèse chez l'hybride FHIA-01 de bananier en culture *in vitro*.

respectivement de $4,6 \pm 1,4$ (ba), $4,1 \pm 1,2$ (cb), $5,3 \pm 0,9$ (a) respectivement pour 0,25 %, 0,50 %, 1,00 % et le contrôle $0,7 \pm 1,7$ (a) (Figure 3).

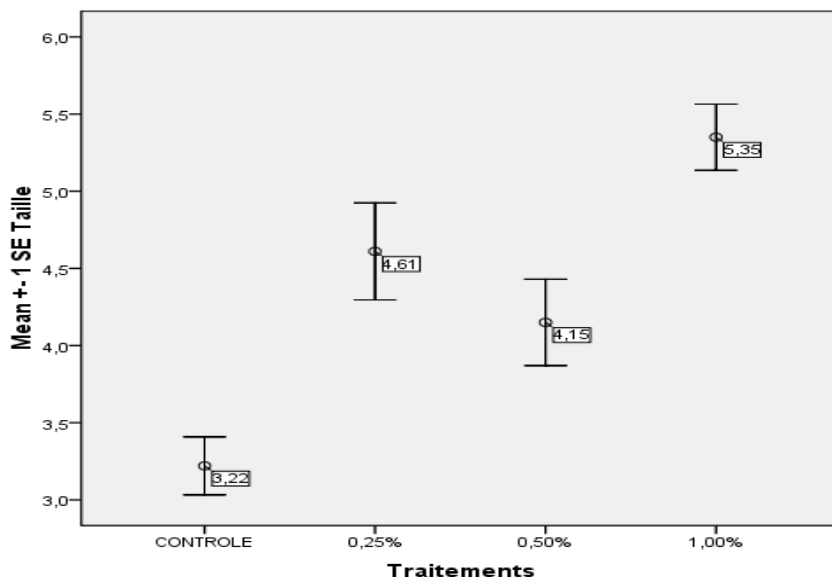


Figure 3. Effet des concentrations croissantes de charbon actif sur la rhizogénèse.

Il ressort du tableau 1 que la taille d'explant, nombre de feuilles émises et nombre de racines révèlent des corrélations négatives significatives avec nombre de

bourgeons proliférés. Par contre, les autres paramètres ont montré des corrélations positives significatives.

Tableau 1 : Les corrélations des paramètres de développement et de croissance aux concentrations croissantes de charbon actif

		Bourgeons	Feuilles	Taille	Racines
Bourgeons	Corrélation de Pearson	1	-,204	-,373**	-,329**
	Sig. (bilatérale)		,070	,001	,003
	N	80	80	80	80
Feuilles	Corrélation de Pearson	-,204	1	,290**	,341**
	Sig. (bilatérale)	,070		,009	,002
	N	80	80	80	80
Taille	Corrélation de Pearson	-,373**	,290**	1	,562**
	Sig. (bilatérale)	,001	,009		,000
	N	80	80	80	80
Racines	Corrélation de Pearson	-,329**	,341**	,562**	1
	Sig. (bilatérale)	,003	,002	,000	
	N	80	80	80	80

** . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

En analyse multivariée (analyse discriminante), il a été constaté que seules la prolifération de bourgeons, l'induction de racines et la taille d'explant étaient

significativement influencées par les différentes doses de charbon actif avant classement (Tableau 2).

Mazinga et al. J. Appl. Biosci. 2014. Effets du charbon actif dans le milieu de culture sur l'induction de la rhizogénèse chez l'hybride FHIA-01 de bananier en culture *in vitro*.

Tableau 2 : Résultats de l'analyse multivariée avant classement des effets des doses croissantes de charbon actif et sur la rhizogénèse

Paramètres	Doses de charbon actif (%)				Valeurs de p
	Contrôle	0,25	0,50	1,00	
Bourgeons	0,7±1,1	0,1±0,4	0,1±0,3	0,1±0,4	0,014
Feuilles	3,8±0,9	3,7±0,8	3,7±0,9	3,7±0,5	0,974
Taille	3,2±0,8	4,6±1,4	4,1±1,2	5,3±0,9	<0,05
Racines	3,2±1,5	5,6±1,3	3,8±1,9	5,2±1,4	<0,05
Classement (%)	50	45	35	55	

L'analyse multivariée (analyse discriminante) après classement, a montré que, tous les paramètres : prolifération de bourgeons, induction de racines et taille

d'explant ont maintenu leur positionnement significatif avec des moyennes appropriées à chaque traitement (Tableau 3).

Tableau 3 : Résultats de l'analyse multivariée après classement des effets des doses croissantes de charbon actif et sur la rhizogénèse

Paramètres	Doses de charbon actif (%)				Valeurs de p
	Contrôle	0,25	0,50	1,00	
Bourgeons	1±1	0,04±0,02	0,04±0,2	0,1±0,4	<0,05
Feuilles	4±0,9	3,6±0,6	3,5±0,8	3,7±0,8	<0,199
Taille	2,8±0,6	4,3±0,7	3,8±0,8	6±0,8	<0,05
Racines	3±1,7	6±1	3,2±1,2	5,2±1,4	<0,05
Classement (%)	93	95	86	88	

Le pourcentage de « bien classé » avant classement était de : 50 %, 45 %, 35 %, et 55 %, respectivement pour les traitements: contrôle, 0,25 %, 0,50 %, 1,00 % charbon actif. Après amélioration du classement le

pourcentage est passé de 93 %, 95 %, 86 %, et 88 %. Illustrant une séparation nette entre les barycentres de chaque traitement (Figure 4).

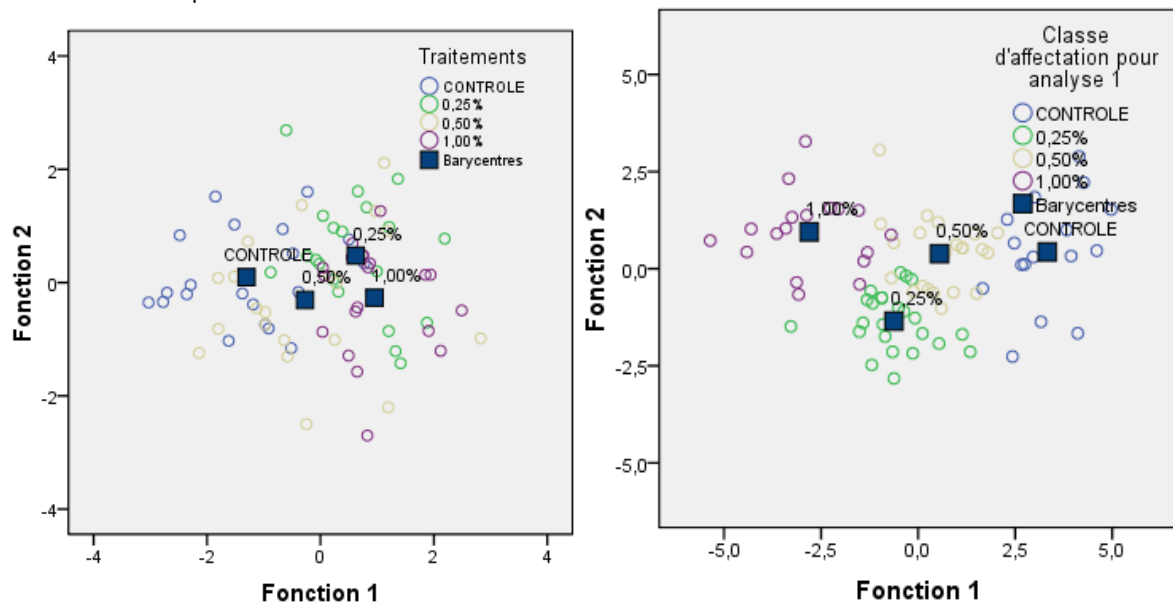


Figure 4 : Fonctions discriminantes canoniques des effets des doses croissantes de charbon actif et sur la rhizogénèse.

DISCUSSION

Dans cette étude, il ressort des résultats obtenus au bout de 6 semaines de la phase d'enracinement *in vitro*, d'une manière générale que les différents traitements ont tous abouti à une rhizogénèse. Les résultats similaires ont également été obtenus par Bettaieb et al. (2007) dont les essais d'enracinement *in vitro* en présence de charbon actif 2 g.l⁻¹ ont abouti à une rhizogénèse générale des pousses mises en culture. Au regard de ces résultats sur le nombre de racines néoformées, il est important de signaler que l'enracinement augmente suivant une certaine gamme des concentrations inférieures (0,25 %) et supérieures (1,00 %) de charbon actif. Ces résultats s'expliquent par l'effet de noircissement du milieu de culture par le charbon actif similairement à l'obscurité. Le charbon actif stimule l'enracinement contrairement à l'obscurité qui affecte la qualité des pousses en raison de leur étiolement (Koné et al., 2010). Aucun cas d'étiolement de pousses n'a été enregistré en présence de charbon actif dans cette étude. Damiano (1980) a remarqué que l'addition de 1 à 2 g/l de charbon actif au milieu d'enracinement réduit le temps nécessaire à l'émission des racines et accélère leur croissance. Dans la présente étude, un nombre supérieur de racines a été enregistré sur les milieux de culture contenant 0,25 % de charbon actif soit une moyenne de (5,4 racines) et sur le milieu de culture additionné de 1,00 % de charbon actif (5,2 racines). Par ailleurs, le facteur limitant de l'enracinement est la lumière en l'absence d'auxine exogène. Mateille et Foncelle (1989) ont aussi montré que l'obscurité naturelle permettait une meilleure qualité de l'enracinement. L'effet du charbon

actif est similaire à celui de l'obscurité car ce dernier noircit le milieu (Benderradji et al., 2007). Le charbon actif, connu pour ses effets adsorbants des régulateurs de croissance en culture *in vitro* (Wheatherhead et al., 1979), diminuerait la survie des explants tout en augmentant leur taux d'enracinement (Gübbük et Pekmezci, 2004). L'ajout de 500 mg.l⁻¹ de charbon actif dans le milieu a eu un effet significatif sur l'induction de la rhizogénèse en culture *in vitro* du Fraisier, en réduisant la durée de la phase d'enracinement de 10 à 12 jours (Damiano, 1978). D'autres auteurs ont signalé les mêmes effets d'une concentration de 0,5 à 0,8 g/l (El Hamdouni, 1999; Kyte 1983; Boxus et al., 1984; Desjardins et al., 1987). Le fait de placer les cultures à l'obscurité a un effet positif sur la croissance en taille de vitroplants ; mais dans le cas des résultats de cette étude, l'augmentation de la taille serait due à la couleur sombre du charbon actif mais aussi par l'ajout des vitamines de MS (Mateille et Foncelle, 1988). Par ailleurs, pour certains génotypes (*Musa spp.* groupe ABB et BB) qui produisent des masses compactes des bourgeons, le charbon actif (0,1 à 0,25 %) est ajouté aux milieux de culture de prolifération ou d'enracinement pour améliorer l'élongation des pousses et des racines (Panis et al., 2002). En ce qui la croissance des plantules, le charbon actif exerce un effet inhibiteur, lorsque sa concentration dans le milieu est supérieure à 1,00 %. Une faible prolifération racinaire peut avoir comme origine, la production par l'explant ou la présence dans le milieu de base, des substances chimiques inhibitrices de la morphogénèse (Benderradji et al., 2007).

CONCLUSION

L'enracinement du cultivar hybride FHIA-01 est possible avec l'incorporation du charbon actif dans le milieu de base MS ; 4,405 mg.l⁻¹, additionnés des phytohormones ; 20 µM mT, 1 µM. AIA, du saccharose 20 g.l⁻¹ et de l'Agar 7 g.l⁻¹. La réponse des traitements étudiés de par les observations faites sur le nombre de racines formées par explant indique que les concentrations en charbon actif de 0,25 % et 1,00 % incorporées dans le milieu de culture de base sont

nettement meilleures comparativement aux autres traitements (sans charbon actif, 0,50 %). L'incorporation de 1,00% de charbon actif a donné une réponse nettement meilleure pour l'expression de la variable mesurée sur la croissance de l'explant initial au bout de 45 jours d'enracinement *in vitro*. Ces quatre traitements diffèrent peu pour l'expression d'émissions foliaires mais elles diffèrent significativement pour l'induction de bourgeons.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le laboratoire de *culture in vitro* du CARAH asbl (Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la province de Hainaut) en Belgique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ben Abdallah., Elloumi N., Bayouh CH., Chaibi N., Lepoivre P., Harrzallah H., 1989. Analysis of pollen androgenetic capacity of male Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) genotypes. *The International Conference on Date Palm. Assiut University. Egypt*, November 9–11.
- Benderradji L., Bouzerzour H., Ykhlef N., Djikoun A., Kellou K., 2007. Réponse à la culture *in vitro* de trois variétés de l'Olivier (*Olea europaea* L.). *Sciences & Technologie* 26 :27-32.
- Bettaieb T., Denden M., Hajlaoui I., Mhamdi M., Methouthi M., 2007. Multiplication et bulbaison *in vitro* du glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.). *Tropicultura*, 25 (4): 228-231.
- Boxus P., Damiano C., Brasseur E., Strawberry, Ammirato P.V., Evans D.A., Sharp W.R., Yamada Y., 1984. *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 3, New York: Macmillan, p 453-486.
- Chaibi N., Abdallah B.A., Harzallah H., Lepoivre P., 2002. Potentialités androgénétiques du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. et culture *in vitro* d'anthers. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6 (4) : 201–207.
- Daguin F., Letouze R., 1989. Biotechnologie du palmier dattier. Nouvelles approches des conditions de post *in vitro* et de la conservation de génotypes sélectionnés. *Compte rendu. Premier séminaire maghrébin sur la génétique de la résistance du palmier dattier. Projet de lutte contre le bayoud FAO/PNUD/RAB/88/024. Adrar, Algérie, 2–7 décembre.*
- Damiano C., 1978. Il carbone attivo nella coltura *in vitro* della fragola. *-Frutticoltura*, 40(5) : 49-50.
- Damiano C., 1980. Strawberry micropropagation. - In Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture: Applications and feasibility. Beltsville, Maryland, USDASEA, *Agricultural Research Results*, ARR-NE-11, p 11-22.
- Desjardins Y., Gosselin A., Yelle S., 1987. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 112(5): 846-851.
- El Hamdouni E.M., Lamarti A., Badoc A., 1999. La régénération *in vitro* du Fraisier (*Fragaria xananassa* Duch.). *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 138: 19-48.
- Grant N.J., Hammatt H., 1999. Increasing root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: Effect of subculture frequency. *Tree physiology*, pp 899-903.
- Gübbük H., Pekmezci M., 2004. *In vitro* Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.), *Turk J Agric For* 28: 355-361.
- Koné T., Koné M., Koné D., Kouakou T.H., Traoré S. & Koudio Y.J., 2010. Effet de la photopériode et des vitamines sur la micropropagation du bananier plantain (*Musa* AAB) à partir de rejets écailles de rang 1. *Journal of Applied Biosciences* 26: 1675–1686.
- Kyte L., 1983. Plants from test tubes. An introduction to micropropagation. Portland, Oregon: Timber Press.
- Letouze R., Daguin F., 1988. Regeneration of date palm by somatic embryogenesis: improved effectiveness by dipping in a stirred liquid medium. *Fruits* 4 (3) :191–194.
- Mateille T., Foncelle B., 1988. Micropropagation of *Musa* AAA cv. Poyo in the Ivory Coast. *Trop. Agric.* 65(4): 325-328.
- Mateille T., Foncelle B., 1989. Techniques de production de vitro-plants de bananier CV. « Poyo ». *Revue Horticole* 294 : 39-45.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-492.
- Naydenov K., Tremblay F., Yves Bergeron Y., Goudiaby V., 2006. Influence du charbon actif sur la croissance primaire des plantules de pin gris. *Can. J. For. Res.* 36 (3): 761–767.
- Panis B., 2009. Cryoconservation de matériel génétique de bananier : 2^{ème} édition. Guides techniques No. 9 (F. Engelmann et. E. Benson, eds). Bioversity International, Montpellier, France. INIBAP ISBN 978-2-910810-87-0.
- Panis B., Strosse H., Van den Hende S., Swennen R., 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem culture. *CryoLettres* 23:375-384.
- Reuveni O., Adato Y., Lilien-Kipnis H., 1972. A study of new and rapid methods for the vegetative propagation of date palms. *Date Grower's Inst. Rep.* 49: 16–24.
- Reuveni O., Lilien-Kipnis H., 1974. Studies of the "in vitro" culture of date palm tissues and

- organs. *Agric. Res. Org. Volcani Center* 145 : 1-42.
- Rugini E., Jacobini A., Lappino M., 1993. Role of basal darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult to root woody species. *Sci. Hort.*, 51: 66-72.
- Rugini E., 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 14: 207-214.
- Sanchez M.C., San-Jose M.C., Ballester A., Vietz A.M., 1996. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Quercus rubra* shoots derived from mature trees." *Tree physiology*, 16: 672-680.
- Tisseart B., 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 30 : 1275-1283.
- Wheatherhead M.A., Burwn J. & Henshaw G.G., 1979. Effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media: Part. II – *Z. Pflanzenphysiol.* 94: 399-405