

Réseaux transnationaux

11. El Hadrami I, Baaziz M. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in *Phoenix dactylifera* L. *Biologia Plantarum* 1995 ; 37 : 205-11.

12. Cherkaoui B. Isolement, identification et lutte contre les contaminations bactériennes en culture *in vitro* chez *Phoenix dactylifera*. Thèse de 3^e cycle. Université Cadi-Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, 1997 ; 123 p.

La sécurité alimentaire : perspectives d'amélioration des bananiers par voie biotechnologique

Robert Haïcour, Viet Bui Trang, Djailo Dhed'a, Akym Assani, Frédéric Bakry, François Xavier Côte

Summary **Integration of biotechnology in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) breeding – mainstay of Moroccan oasis agriculture**

I. EL HADRAMI, ET AL.

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) has a marked socioeconomic impact in the Maghreb region (Photos 1 and 2). It occupies a considerable proportion of cultivated area in some regions and is represented by about 100 million trees. The most important date palm crop zones are in North Africa, where they are a prime source of income for about 10 million people. Date fruit has a key role in oasis life because of its commercial potential (Photo 3), thus permitting other food products to be acquired. Furthermore, cultivated date palms are important in stalling desertification (Photo 4) and sanding-up problems, characteristic of these regions. Could this role be maintained in the future and what degree of biotechnology integration into this system would be required to reach this goal? In Morocco, only 15 to 20% of vitroplant production expectations have been substantiated – in a plan aimed at increasing the overall date palm cropping area, and overcoming problems such as bayoud disease (Photo 5). This deficiency, compared to the national program that started in 1978, is related in part to a poor understanding of micropropagation techniques. Traditional vegetative multiplication of date palm trees using offshoots (Photo 6) has been replaced by the organogenesis technique (Photo 7), i.e. yielding about 150,000 vitroplants from several cultivars for commercial vitroplant production in Morocco. Somatic embryogenesis is only used in a few laboratory for tests (Photos 8 and 9), although it is considered to be a promising technique for the future. This method is known for its high multiplication potential (relative to organogenesis), and could thus be highly useful for breeding programs. In Morocco, to enlarge and rehabilitate the date palm industry through different biotechnological methods, it would be essential to draw up and apply a research policy in this field. This will require better coordination between institutions working in this sector, along with funding to be able to develop the required infrastructures and expertise.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 463-8.

Les plus anciennes références aux bananiers, en Sanskrit, datent de 500 ans avant Jésus-Christ. Le Grec ancien consigne la campagne d'Alexandre le Grand en Inde en 327 av. J.-C. où il est fait mention de la banane. Pline l'Ancien rapporte sur les bananiers (pala) dans son histoire naturelle ; plus tard, la banane apparaît, tant chez les musulmans que chez les chrétiens, comme le fruit défendu du Paradis. Les bananiers sont cultivés essentiellement pour la consommation de leurs fruits ; cependant, les diverses portions de la plante donnent lieu à des utilisations très diverses telles que couverture d'abris ou emballage des denrées alimentaires avec les feuilles ou portions de limbes, alimentation du bétail, confection de flotteurs avec les pseudotruncs, fourniture de fibres provenant des faisceaux libéro-ligneux des gaines foliaires, décoration avec les inflorescences, dégustation sous forme de légume des bourgeons floraux, modèles architecturaux pour la décoration des lieux de culte, etc. Les bananiers et bananiers plantains (bananiers à cuire) sont cultivés sur les cinq continents, dans près de 120 pays des zones tropicales et

subtropicales. Les productions bananières ont un rôle majeur à différents niveaux : alimentaire (c'est la nourriture de base d'une population estimée à plus de 400 millions d'individus), social et économique, ainsi que environnemental. La production annuelle de bananes a été estimée à plus de 81 millions de tonnes [1] dont 36 % issus de l'Amérique latine, 34 % de l'Afrique et 29 % de l'Asie et du Pacifique. On distingue deux grandes filières de production : celle des bananiers en culture pure dont les fruits sont destinés aux exportations (représentant près de 12 % de la production mondiale) et celle des bananiers destinés à l'approvisionnement des marchés locaux souvent cultivés en cultures associées. Cette production vivrière provient de petites exploitations familiales dans lesquelles les résidus fournissent du paillis et les feuillages assurent une protection pour d'autres plantes telles que haricots, arachides, caféiers.

Données biosystématiques

Les bananiers sont des monocotylédones zingibérales de la famille des musacées appartenant au genre *Musa* section *eumusa* ($2n = 22$). Les bananes comestibles sont issues, pour l'essentiel, de deux espèces sauvages diploïdes, *M. acuminata* (génomme A) et *M. balbisiana* (génomme B). Les plantes de ces deux espèces portent des fruits remplis de graines et se reproduisent aussi bien par voie sexuée que par multiplication végétative à partir des rejets provenant du développement des bourgeons axillaires souterrains portés par un bulbe solide ou corme (*figure 1*). Les processus d'évolution et de domestication ont abouti à la sélection par l'hom-

R. Haïcour, A. Assani : Laboratoire de morphogénèse végétale expérimentale, Bâtiment 360, Université de Paris Sud XI, 91405 Orsay cedex, France.

V.B. Trang : Laboratoire de physiologie végétale, Faculté des sciences, 450, Nguyen Thi Minh Khai, P5 Q3 TP Hochiminh, Vietnam.

D. Dhed'a : Université de Kisangani, Faculté des sciences c/o Ridja D. Buma, Sotexki BP 14897 Kinshasa 1, République démocratique du Congo.

F. Bakry, F.X. Côte : CIRAD FLHOR, avenue du Val-Montferand, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 1, France.

Tirés à part : R. Haïcour

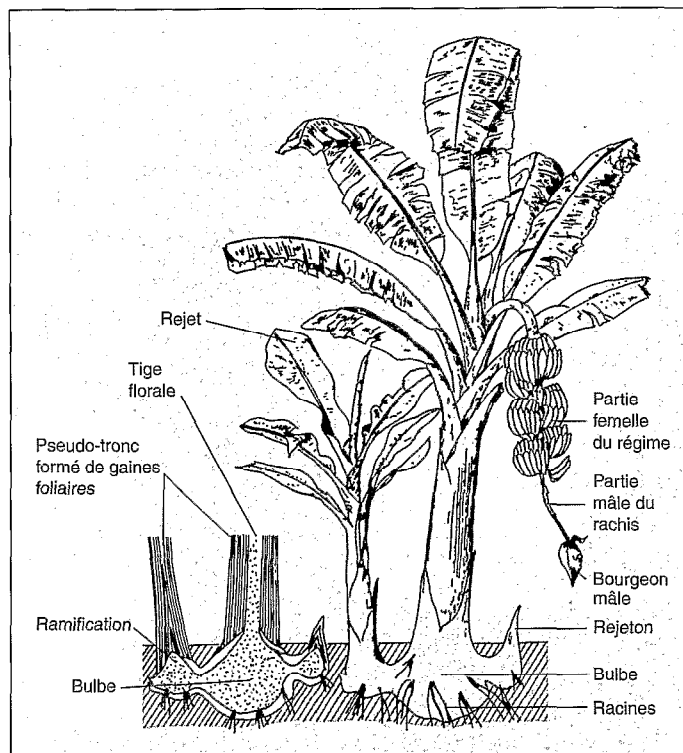


Figure 1. Représentation d'un bananier au moment de la fructification avec ses rejets et coupe longitudinale de la tige.

Figure 1. Schematic representation (vegetative and reproductive parts) of a banana plant and its suckers.

me de variétés stériles et parthénocarpiques chez lesquelles la pollinisation des fleurs n'est plus nécessaire pour la formation des fruits. Les variétés actuellement consommées sont, pour la plupart, des clones triploïdes stériles, aspermes, issus tantôt de la seule espèce *M. acuminata* (groupe AAA), tantôt de croisements interspécifiques entre les espèces *M. acuminata* et *M. balbisiana* (groupes AAB et ABB). Il existe plus rarement des variétés diploïdes (AA et AB) et des clones tétraploïdes de nature interspécifique. La taille, la forme, la couleur des plantes, des régimes et des fruits ainsi que les caractères de la pulpe sont autant de critères qui permettent de différencier les variétés entre elles. Ainsi, parmi les bananes à cuire, les Plantains (AAB) possèdent une pulpe orangée très ferme que l'on ne retrouve pas chez les autres bananes à cuire (Laknao-AAB, Popoulou-AAB, Bluggoe-ABB et Monthan-ABB). Les bananes d'Afrique de l'Est sont très spécifiques et utilisées, selon les clones, pour la cuisson ou la fabrication de bière. Les parfums des bananes desserts sont variés ainsi que leurs goûts : très sucrés chez certains cultivars diploïdes (Figue Sucrée - AA), doux-acidulés chez les Figue Pomme (AAB) du Brésil, neutres et universellement appréciés chez les bananes Cavendish (AAA) d'exportation.

Une culture fragilisée par les maladies et les prédateurs

Les bananiers se comportent comme des herbes géantes et pérennes pour lesquelles la rotation de culture avec d'autres végétaux n'est guère pratiquée. D'autres caractéristiques viennent renforcer la vulnérabilité de cette production, notamment la propagation végétative (qui génère un mode de production monoclonale dans les grandes plantations industrielles), ainsi que l'extension mondiale des maladies et l'apparition de nouvelles races d'agents pathogènes. À l'heure actuelle, la totalité de la production des bananiers pour l'exportation provient du seul sous-groupe Cavendish où les cultivars ne diffèrent entre eux que par des mutations, importantes pour les agronomes, mais sans signification d'un point de vue génétique. Il ne s'agit au total que d'une dizaine de clones (Lacatan, Valéry, Poyo, Grande Naine et Petite Naine, William, etc.) distingués par leur taille et quelques caractères associés mais en revanche impossibles à différencier par les méthodes les plus fines de la biologie moléculaire. Ils ont, en outre, sensiblement le même comportement vis-à-vis du complexe parasitaire.

La maladie de Sigatoka (MS) et la maladie des raies noires (MRN) (appelées communément cercosporioses) sont de graves maladies foliaires du bananier provoquées par deux champignons pathogènes, dont l'espèce *Mycosphaerella fijiensis* (agent de la MRN) prédomine actuellement dans les différentes zones de production. Depuis les années 70, cette espèce, plus agressive, s'est progressivement substituée à l'espèce *M. musicola* (agent de la MS) qui subsiste uniquement en zones d'altitude et dans les régions non encore atteintes par la MRN (les Caraïbes). Sans traitement, ces deux maladies entraînent d'importantes chutes de rendement, voire une perte totale des récoltes. Elles affectent les bananiers en culture industrielle dont les fruits sont voués à l'exportation mais aussi les variétés-vivrières locales dont les fruits sont consommés crus ou en légume après cuisson.

Les études menées sur la structure génétique des populations de *M. fijiensis*, analysée à l'échelle mondiale par RFLP, ont montré qu'une forte diversité était maintenue dans chaque région de production : ces régions pourraient représenter des zones épidémiologiques distinctes [2]. Cette forte diversité des pathogènes s'est illustrée notamment aux îles Fidji par le contournement de résistance à la MRN d'un clone de bananiers issu d'une espèce sauvage notoirement utilisée en croisement pour conférer cette résistance aux variétés cultivées. Un autre exemple de variabilité des populations pathogènes nous est donné avec la maladie de Panama, dont l'agent pathogène est le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense qui obstrue les tissus vasculaires des plantes. Les travaux de génétique et de biologie moléculaire ont montré que cette espèce de champignon était aussi très diversifiée. Une étude menée sur de nombreux isolats asiatiques de l'agent pathogène a mis en évidence que certaines souches spécifiques avaient co-évolué avec les clones de *M. acuminata* dans la péninsule Indo-Malaise alors que d'autres souches avaient co-évolué avec *M. balbisiana* dans le nord de l'Asie. Les variétés d'exportation (groupe des Cavendish), connues pour être résistantes à la race 1 de ce pathogène en zone tropicale, sont susceptibles à la race 4, jusqu'alors confinée aux zones subtropicales de production. Des observations récentes indiquent que ces mêmes variétés de bananiers pouvaient être affectées maintenant par la race 4 en conditions tropicales à Sumatra et en Malaisie [3], ce qui est très préoccupant pour l'avenir des productions bananières dans cette région.

Outre une modification des pratiques culturales, l'amélioration des variétés existantes et

Réseaux transnationaux

la création de nouveaux cultivars résistants aux maladies permettraient d'éviter une baisse de productivité, alors que corrélativement les besoins s'accroissent, notamment en liaison avec la démographie. En effet pour la plupart des affections (maladie de Panama due à *F. oxysporum*, maladie de Moko due à *Pseudomonas solanacearum*, le Bunchy Top dû au virus BBTV), il n'y a pas de traitement chimique fiable, la destruction des plantes atteintes étant la seule méthode efficace de contrôle. Pour les autres maladies (prédateurs tels que charançons, nématodes, maladie des raies noires due à *M. fijiensis*), le coût des traitements chimiques s'accroît d'autant que de nouvelles souches très virulentes apparaissent. Ce coût devient donc prohibitif pour les petits fermiers, les traitements étant parfois même difficiles à réaliser (du fait de la dispersion des bananiers de case), voire dangereux pour les agriculteurs et l'environnement. Il faut donc, dans ce contexte, avoir recours à d'autres méthodes afin de pourvoir les actuels cultivars de résistances ou de créer de nouveaux génotypes performants.

Amélioration des bananiers

Création variétale par croisements

L'amélioration génétique des bananiers est menée de par le monde par de nombreux groupes de chercheurs appartenant au CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement), à la FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola), à l'ITA (Institute of Tropical Agriculture), au CRBP (Centre de recherches régionales sur bananiers et plantains), à l'EMBRAPA-CNPMP (Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, Brésil). À l'échelle mondiale, deux stratégies distinctes de création variétale sont utilisées : la première vise l'obtention de variétés tétraploïdes, la seconde l'obtention de variétés triploïdes. En dépit de leur forte stérilité, certaines variétés triploïdes produisent de rares gamètes maternels non réduits ($n = 3x = 33$) qui, après fécondation avec du pollen d'un clone diploïde, seront à l'origine de graines contenant des embryons tétraploïdes, susceptibles de germer [4, 5]. Une première stratégie d'amélioration génétique consiste à associer l'intégralité du génome de la variété cultivée à un génome paternel haploïde porteur de résistances, pour créer des hybrides proches de la variété maternelle

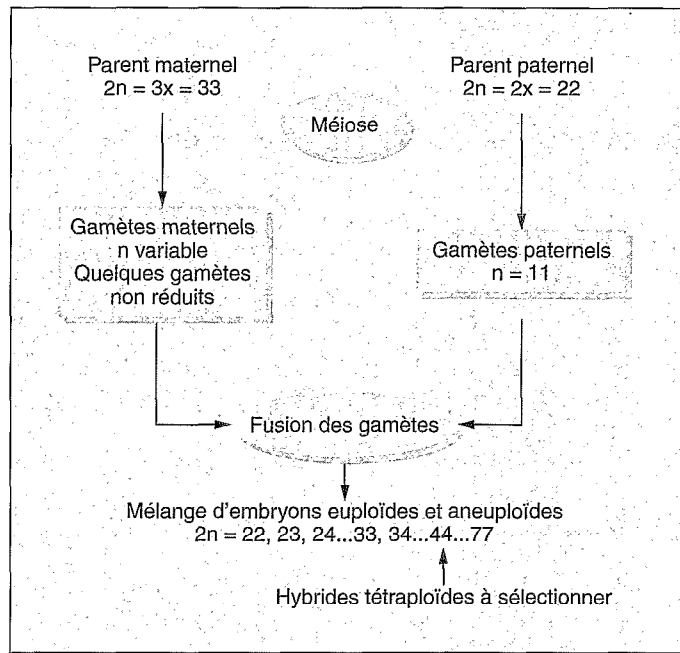


Figure 2. Création de variétés tétraploïdes de bananier par non-réduction des gamètes maternels de variétés triploïdes.

Figure 2. Conventional tetraploid breeding in banana.

de référence et résistants aux maladies (figure 2). Ce schéma, développé dès 1922 pour conférer la résistance à la maladie de Panama à la variété Gros Michel, a été repris ultérieurement pour d'autres variétés de type « dessert » et « à cuire » pour la résistance à la maladie des raies noires (MRN) et aux nématodes. Les gamètes triploïdes du parent maternel étant fixés (ou très faiblement variables en raison d'éventuelles recombinaisons), tous les efforts d'amélioration doivent porter sur les parents paternels. Ces derniers peuvent être des espèces sauvages sans valeur agronomique mais porteurs de résistances, mais aussi et surtout des clones élites issus d'amélioration intensive de variétés diploïdes, associant des résistances aux maladies, des tolérances aux ravageurs et de

bonnes caractéristiques de régime [6]. Cette stratégie permet, si ces caractères sont transmis aux descendances, de produire en une seule hybridation des individus résistants ayant un bon potentiel de production. Elle n'a toutefois pas que des avantages et se heurte à des contraintes, à commencer par la faible fertilité des parents femelles qui impose un lourd travail de pollinisation avant d'obtenir des descendances en nombre suffisant. Les plantes hybrides ont un port retombant, caractéristique des clones tétraploïdes, qui leur confère une tendance à la cassure des pétioles foliaires en période ventée. Enfin, plus fertiles que les triploïdes, ils produisent occasionnellement des graines très dures, qui rendent les fruits impropres à la consommation. Les essais de

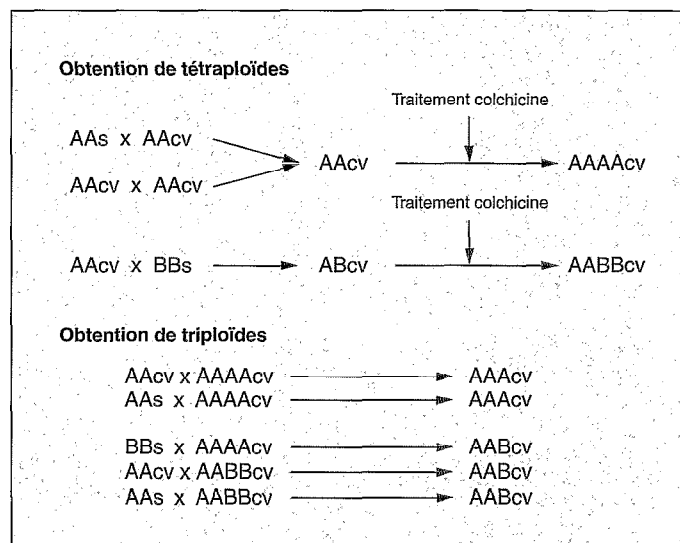


Figure 3. Création de variétés triploïdes de bananier à partir de clones diploïdes. S : sauvage ; cv : cultivé.

Figure 3. Alternative CIRAD strategy in triploid banana production through the improvement of diploid clones. S : wild ; cv : cultivated.

retrocroisement de ces tétraploïdes avec d'autres diploïdes améliorés n'ont jamais débouché sur la production d'hybrides triploïdes intéressants (en raison probablement de l'éclatement du noyau maternel dans la méiose du tétraploïde). C'est donc une amélioration en « cul-de-sac » interdisant toute stratégie de récurrence pour améliorer le parent polyploïde. Le CIRAD, pour sa part, a développé une stratégie originale d'amélioration fondée sur la création de triploïdes à partir du matériel végétal diploïde naturel ou amélioré [7]. Après avoir été sélectionnés, les meilleurs diploïdes sont traités à la colchicine pour induire la formation d'auto ou d'allotétraploïdes (figure 3). Puis ces tétraploïdes et d'autres diploïdes sont croisés en vue de la synthèse d'individus triploïdes. Cette approche présente au moins quatre avantages :

- les structures génétiques sélectionnées au niveau diploïde sont conservées en tout ou partie dans les triploïdes finaux ;
- la nature triploïde des hybrides leur confère la stérilité souhaitée ;
- l'utilisation de parents sauvages très fertiles permet de produire, dans certains cas, de nombreuses descendances triploïdes au sein desquelles il est aisé de sélectionner ;
- enfin, cette stratégie de création permet d'utiliser la grande diversité du matériel végétal diploïde.

De nouveaux critères de sélection peuvent être intégrés à tout moment pour répondre rapidement à l'apparition de nouvelles races de champignons pathogènes ou à de nouveaux objectifs de sélection par l'emploi de nouveaux parents. De nombreux hybrides triploïdes mono et interspécifiques ont été obtenus, dont certains sont déjà en phase de développement. Les premières observations montrent que les triploïdes AAA et AAB se caractérisent par une plus grande vigueur, une grosseur et un poids moyen des régimes plus élevés que ceux des diploïdes. La variabilité interfamille des descendances est fortement dépendante des couples de parents choisis et, dans tous les cas, bien supérieure à la variabilité intrafamille. Ce travail de création repose sur une large exploitation des ressources génétiques disponibles. Il nécessite une bonne connaissance des relations phylogéniques entre les variétés cultivées, les espèces sauvages et les cultivars ancestraux.

Apports des biotechnologies à l'amélioration des bananiers

En complément des programmes d'amélioration génétique par croisements, des

méthodes non conventionnelles ont été ou sont en cours de développement afin de lever certains verrous liés en particulier à la biologie des bananiers cultivés.

La micropropagation *in vitro* des bananiers par la prolifération de méristèmes végétatifs *in vitro* a connu un essor remarquable au cours de la dernière décennie [8, 9]. Compte tenu de la stérilité des bananiers cultivés, les rejets constituent le matériel habituel de plantation au champ. Les principaux défauts des rejets sont leur médiocre qualité sanitaire (présence de ravageurs, contamination par des virus, des bactéries ou des champignons) ainsi que leur encombrement important et l'irrégularité de leur multiplication. L'utilisation des techniques de micropropagation par bourgeonnement *in vitro* a constitué l'un des changements majeurs intervenus dans la culture des bananiers depuis une dizaine d'années. Avec un marché annuel proche de 40 millions de vitroplants, le bananier est l'une des plantes de grande culture les plus multipliées *in vitro*. L'intérêt du vitroplant est lié à sa bonne qualité sanitaire vis-à-vis des ravageurs, bactéries et champignons, à sa rapidité de multiplication, à ses performances agronomiques. En particulier, l'utilisation des vitroplants permet de mieux contrôler les infestations racinaires dues aux nématodes (*Radopholus similis* notamment), l'une des principales contraintes de la culture. L'utilisation de matériel de plantation sain, associée à des techniques culturales comme la jachère, permet de réduire la fréquence d'application des traitements nématicides. D'un point de vue agronomique, les vitroplants se distinguent par un développement à la fois plus rapide et plus homogène et par une productivité généralement supérieure à celle obtenue avec du matériel de plantation classique. La prévention des virus chez les plants à multiplier constitue une étape essentielle pour garantir la qualité sanitaire des vitroplants. Cela étant, de nombreuses variations morphologiques et agronomiques sont apparues sur des plantes issues de prolifération *in vitro* [10]. Le développement de la micropropagation nécessite donc une maîtrise des causes de la non-conformité des vitroplants [11]. À l'inverse, plusieurs équipes de recherche se sont attachées à utiliser la variabilité générée par la vitroculture sur les bananiers du sous-groupe Cavendish, en sélectionnant des variants somaclonaux [12], en association parfois avec un traitement préalable d'induction de mutations [13]. Ainsi, un clone variant, Pei-Chiao, a été sélectionné à Taiwan pour sa résistance à la maladie de Panama, race 4. Ce clone, alors porteur de caractères agronomiques défa-

vorables, après avoir été multiplié *in vitro*, a fait l'objet d'une autre sélection débouchant sur des individus résistants à la maladie et améliorés pour les caractères de production [14].

Approche moléculaire

Les marqueurs moléculaires RFLP nucléaires et cytoplasmiques ont permis de caractériser la variabilité génétique, de déterminer le taux d'hétérozygotie de certains clones et de préciser les relations phylogénétiques entre les formes sauvages et les formes cultivées [15]. On a pu aussi montrer chez le bananier une hérédité maternelle du génome chloroplastique et une transmission paternelle du génome mitochondrial [16]. Ces données ont, par la suite, permis de préciser la généalogie des variétés triploïdes actuelles à partir des variétés diploïdes conservées en collections et originaires du bassin de diversification du genre. Par ailleurs une première carte génétique du bananier a abouti au positionnement de 90 loci (58 marqueurs RFLP, 4 marqueurs isozymes et 28 marqueurs RAPD) dont 77 ont pu être répartis en 15 groupes de liaisons et 13 loci indépendants. Cette carte a été complétée avec 30 marqueurs microsatellites. Une seconde carte a été établie : elle comporte environ 350 marqueurs répartis en 11 groupes de liaisons correspondant au nombre génomique de base des bananiers [17]. L'étude combinée de ces deux cartes a fourni la première ébauche d'une carte squelette consensus basée sur 130 marqueurs « locus spécifique » qui pourra être mise à profit pour poursuivre des stratégies de sélection assistée par marqueurs.

Haplométhodes

À l'exception des bananiers sauvages, tous les diploïdes utilisés en hybridation présentent une hétérozygotie génique (20 à 70 %) et de l'hétérozygotie structurale (translocations et inversions de portions de chromosomes), qui renforcent leur stérilité et induisent une forte variabilité des populations gamétiques quand elles existent. L'efficacité des programmes d'amélioration pourrait être accrue en utilisant des lignées plus fertiles. Les premières plantes androgénétiques de bananiers ont été obtenues par culture d'anthers du clone sauvage « Long Tavoy » de l'espèce *M. acuminata* [18]. Les facteurs qui gouvernent l'induction des cals androgénétiques (stades de prélèvement des anthers, milieu de culture) et la régénération de plantes entières ont pu être précisés par la suite. À ce jour, de nombreux cals (photo 1) et plantes haploïdes, diploïdes, tétraploïdes et mixo-

Réseaux transnationaux

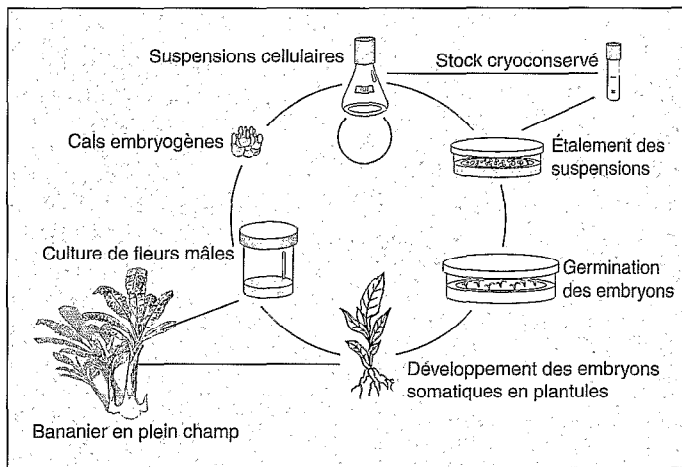


Figure 4. Cycle de l'embryogenèse somatique induite à partir de fleurs mâles de bananier.

Figure 4. Micropropagation of banana vitroplants through somatic embryogenesis from male flowers.

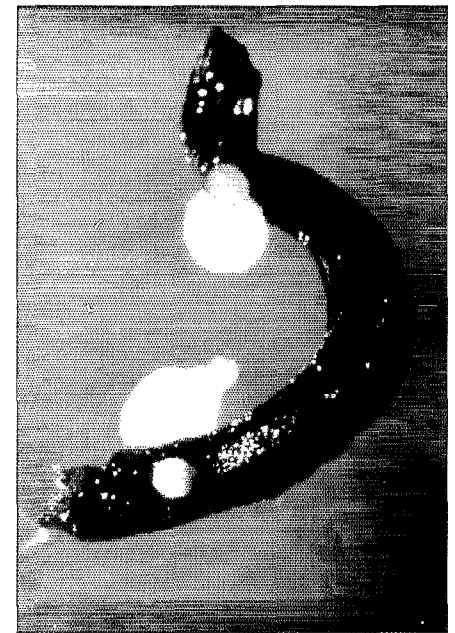


Photo 1. Cal androgénétique sur anthère de bananier diploïde.

Photo 1. Induction of androgenic callus on diploid *Musa* species anther.

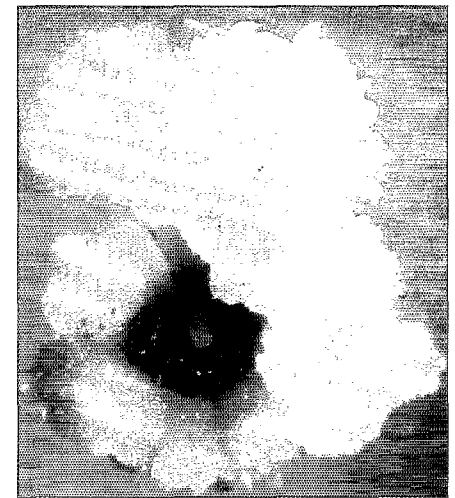


Photo 2. Cal embryogène issu de la culture de jeune fleur mâle de bananier.

Photo 2. Embryogenic callus on immature male flowers of banana.

ploïdes ont été obtenus à partir de différents clones de *M. acuminata* et de *M. balbisiana*. Parmi les utilisations des structures haploïdes, il convient de mentionner dès à présent les protoplastes issus de cals androgénétiques, comme éléments parentaux pour la fusion de protoplastes.

Culture d'embryons zygotiques

Les graines de bananiers qui résultent des pollinisations manuelles sont souvent mal formées et parfois immatures. En semis de pépinière, leur taux de germination est très faible, de l'ordre de 0 à 25 % selon les croisements. Le sauvetage d'embryons *in vitro* a augmenté très significativement ce taux, qui peut atteindre jusqu'à 95 % dans les conditions optimales [5]. Dans les programmes d'amélioration des bananiers, le recours systématique à cette technique a fourni des descendance plus nombreuses et de nouvelles combinaisons parentales.

Développement des suspensions cellulaires

Les suspensions cellulaires chez le bananier sont à l'origine du développement de l'embryogenèse somatique, de la mise en œuvre de la cryoconservation, des transformations génétiques et constituent le matériel le plus utilisé comme source de protoplastes. L'initiation de suspensions cellulaires embryogènes a été réalisée à partir de cals embryogènes issus d'embryons immatures de taxons diploïdes séminifères [19-21], de cals originaires de tissus du corme ou de la base des jeunes feuilles [22], de scalps provenant de la prolifération d'apex de rejets cultivés *in vitro* [23], ou de cals embryogènes issus de

culture de jeunes fleurs mâles permettant le développement d'un système de multiplication adventive d'embryons somatiques chez plusieurs cultivars [19].

Le développement de cette technique a servi à l'établissement de suspensions cellulaires avec les bananiers à cuire (cv. French Sombre) [24] et dessert (cv. Grande Naine) [25] (figure 4). Des cals blancs, friables, porteurs de nombreux proembryons ont été obtenus après 5 à 6 mois de culture des jeunes fleurs mâles sur des milieux solides (photo 2). Enfin des résultats très positifs ont été obtenus par le CIRAD et le CATIE (Costa Rica) avec des clones de bananiers ne portant pas de fleurs mâles (utilisation des fleurs femelles). Après avoir transféré ces cals en milieu liquide, des suspensions cellulaires ont été initiées, amplifiées et maintenues pendant plus de 15 mois successifs. Les suspensions sont composées de petits agrégats eux-mêmes constitués de cellules rondes pourvues d'un gros noyau, mais ne contenant que très peu de réserves protéiques et amylacées (dans le cytoplasme et les vacuoles). L'origine unicellulaire des embryons somatiques étudiés a été précisée grâce aux études cytologiques. L'étalement de 1 ml d'une suspension embryogène permet la régénération de plus de 10^5 embryons, dont 5 à 40 % selon les cultivars germeront pour évoluer en plante entière. Les essais agronomiques menés en Martinique depuis 1996 avec la variété Grande Naine ont montré que les plantes issues d'embryogenèse somatique étaient en tout point conformes à la variété de référence. Leurs performances agronomiques sont équivalentes à celles des vitroplants classiques produits par prolifération de bourgeons. Une part importante des travaux est consacrée maintenant au transfert à l'industrie de cette nouvelle technologie, qui permettrait d'accroître la qualité

des plants pour un coût inférieur au prix actuel du vitroplant de bananier.

La cryoconservation a été envisagée pour conserver à long terme les ressources génétiques de bananiers. Cette technique évite le repiquage des plantes *in vitro* qui représente une lourde charge de travail pour l'entretien de grandes collections et peut aussi générer l'apparition de mutations ou

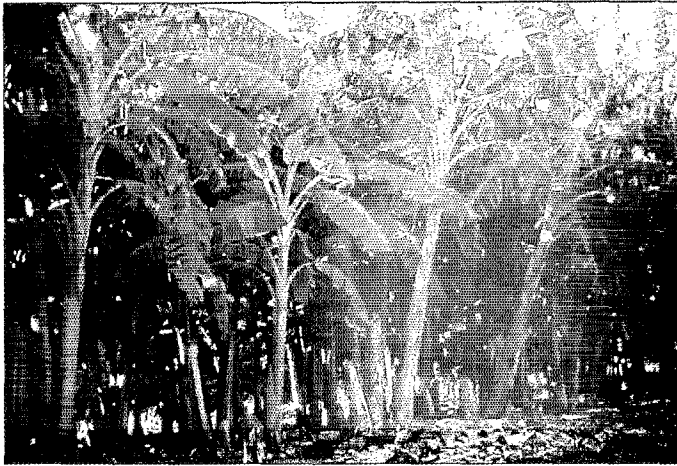


Photo 3. Plants de bananier (ABB) au champ, issu de protoplastes.

Photo 3. Field evaluation of banana plants derived from protoplasts.

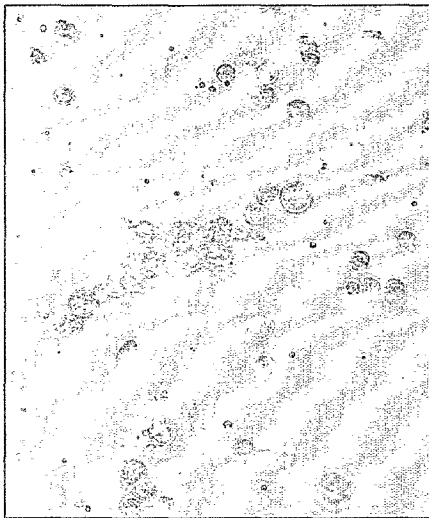


Photo 4. Fusion de protoplastes de bananier.

Photo 4. Protoplast fusion in banana.

occasionner des pertes d'accessions par des contaminations ou des erreurs d'étiquetage [26]. Associée à l'embryogenèse somatique, la cryoconservation (*figure 4*) permettrait de gérer plus facilement une production de vitroplants.

Culture de protoplastes et fusions somatiques

D'une façon générale, on considère que les protoplastes de bananiers sont récalcitrants à la régénération. Cependant, à condition de les cultiver sur couche nourricière ou à très forte densité, deux équipes ont obtenu des régénérants [27, 28]. La fusion de protoplastes a été réalisée à partir de diverses

sources (notamment des feuilles de vitroplants) mais, jusqu'à présent, seuls les protoplastes provenant de suspensions cellulaires embryogènes ont présenté une aptitude au développement conduisant, dans les cas les plus favorables, à la régénération directe *via* l'embryogenèse somatique. Certaines de ces plantes sont en cours d'évaluation agronomique pour étudier l'incidence de l'étape « protoplaste » sur les variations somaclonales (*photo 3*). Ce verrou étant levé, il est désormais possible d'envisager la fusion de protoplastes dans l'optique d'un élargissement de la variabilité (*photo 4*). Cette méthode permettrait d'accélérer les croisements ou même d'effectuer des croisements difficiles ou impossibles à réaliser par hybridation classique, compte tenu de la stérilité de certains « géniteurs » diploïdes. L'hybridation somatique est d'abord envisagée entre bananiers diploïdes pour créer des tétraploïdes, puis des triploïdes par rétrocroisement. Une autre voie étudiée est la création de triploïdes synthétiques par fusion de protoplastes haploïdes et diploïdes, qui fait partie actuellement d'un programme de recherches soutenu par la communauté européenne. Les protoplastes d'origine foliaire pourront être utilisés dans les protocoles de fusion, même s'il ne sont pas régénérants en l'état de protoplastes parentaux. Enfin les protoplastes considérés comme unité cellulaire autorisent la mise en œuvre des transformations par électroporation [29] ce qui théoriquement devrait éviter la formation de chimères.

Transformation génétique

La mise au point des techniques de transformation génétique chez les bananiers est très récente. Elle implique plusieurs centres de recherche spécialisés dans les biotech-

nologies comme l'Université catholique de Leuven (Belgique), l'Université de Cornell (États-Unis), l'IBP (Cuba), l'Université technologique du Queensland (Australie), l'Université de Paris XI Orsay (France), le CIRAD (France) ainsi que des laboratoires privés. Les premiers résultats obtenus en 1992 [30] ont rapidement été suivis de l'obtention de transformants stables de bananier par des bombardements de particules appliqués à des suspensions cellulaires [31] et par inoculations d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des sections de méristèmes végétatifs cultivés *in vitro* [32]. Une grande partie des efforts de recherche a été jusqu'à maintenant consacré à la mise au point des méthodes de transfert de gènes marqueurs, le transfert de gènes d'intérêt agronomique étant susceptible de débiter dans un avenir proche. Parmi ceux-ci, une priorité serait accordée aux gènes de résistance aux virus (*Cucumber Mosaic Virus*, *Banana Bunchy Top Virus*), compte tenu de l'absence de bananier naturellement résistant, et de l'émergence de stratégies visant à l'acquisition de ces résistances par transformation génétique. Les dégâts très importants causés par les organismes fongiques du genre *Mycosphaerella* motivent des recherches de gènes de résistance aux champignons (protéines antifongiques, chitinases). Par ailleurs, les dégâts majeurs occasionnés par les charançons et les nématodes chez les bananiers justifient que les programmes de recherche soient rapidement initiés en ce sens. La modification de voies métaboliques pour le contrôle du mûrissement (gène antisens de l'ACC synthase) est envisagée par plusieurs équipes. La possibilité de produire, dans la banane, l'antigène de l'hépatite B, dans le but de disposer d'un vaccin oral est en cours d'étude par l'Université de Cornell.

Conclusion

En complément des travaux d'amélioration génétique par hybridation et des nouvelles approches biotechnologiques, la connaissance des bananiers s'est considérablement accrue au cours de la dernière décennie. Les outils ainsi forgés ont déjà permis une meilleure diffusion du matériel végétal ainsi que la création de nouvelles variétés. L'ensemble de ces techniques contribue et contribuera sans nul doute à l'amélioration tant qualitative que quantitative de la production bananière. En ce sens, elles participent significativement au renforcement de la sécurité alimentaire de la planète ■

Réseaux transnationaux

Remerciements

Les auteurs adressent leurs remerciements à J. Champion, J.-P. Horry et R. Domergue pour la réalisation des figures 1, 2 et 4 et R. Domergue pour les prêts de photographies pour ce document. Les auteurs adressent aussi tous leurs remerciements à la CEE qui a soutenu ces activités de recherche à travers les programmes STD-DG XII et actuellement INCO-DC -DGXII, ainsi qu'à l'AUFEL-UREF pour l'intérêt et le soutien financier qu'elle a apportés dans le cadre des RTR.

Références

- FAO. Rapport annuel 1996.
- Carlier J, Lebrun MH, Zapater MF, Dubois C, Mourichon X. Genetic structure of the global population of Bananas black leaf streak fungus *Mycosphaerella tijiensis*. *Molecular Ecology* 1996 ; 5 : 499-510.
- Pegg KG, Moore NY, Sorensen S. Variability in populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Asia/Pacific region. In : *The improvement and testing of Musa : a global partnership*. Montpellier : INIBAP, 1994 : 70-82.
- Menendez T, Shepherd K. Breeding new bananas. *World Crops* 1975 : 104-12.
- Bakry F, Horry JP. Tetraploid hybrids from inter-ploid 3x x 2x crosses in cooking bananas. *Fruits* 1992 ; 47 : 641-7.
- Rowe P, Rosales F. Genetic improvement of banana, plantains and cooking banana in FHIA, Honduras. In : Ganry J, ed. *Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests*. Montpellier : INIBAP, 1993 : 243-66.
- Bakry F, Horry JP, Teisson C, Tézenas du Montcel H, Ganry J. L'amélioration génétique des bananiers à l'IRFA-CIRAD. *Fruits* 1990 ; n° spécial : 25-40.
- Cronauer SS, Krikoran AD. Banana. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 1986 ; 1 : 233-52.
- Teisson C, Côte FX. Micropropagation of *Musa* species (Bananas). High-Tech and Micro propagation. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 1997 ; 39 : 103-26.
- Vuylsteke D, Swennen R, de Langhe E. Somaclonal variation in plantains (*Musa* spp. AAB group) derived from shoot-tip culture. *Fruits* 1991 ; 46 : 429-39.
- Côte FX, Sandoval J, Marie P, Auboiron E. Variations in micropropagated bananas and plantains : literature survey. *Fruits* 1993 ; 48 : 15-23.
- Daniells JW, Smith MK. Somatic mutation of bananas : their stability and potential. In : Valmayor RV, et al., eds. *Proceedings of the international symposium on recent developments in banana cultivation technology*. Los Banos, Philippines : INIBAP-ASPNET, 1993 : 162-71.
- Novak FJ, Afza R, van Duren M, Omar MS. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (*Musa* cvs.). *Tropical Agriculture* 1990 ; 67 : 21-8.
- Tang CY, Hwang SC. Musa mutation breeding in Taiwan. In : *The improvement and testing of Musa : a global partnership*. La Lima, Honduras, 27-30 avril 1994. Montpellier : INIBAP, 1994 : 219-27.
- Carreel F, Fauré S, Gonzales de Léon D, et al. Évaluation de la diversité génétique chez les bananiers diploïdes (*Musa* sp.). *Génétique, sélection, évolution* 1994 ; 26 (suppl. 1) : 125-36.
- Fauré S, Noyer JL, Carreel F, Horry JP, Bakry F, Lanaud C. Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in bananas (*Musa acuminata*). *Current Genetics* 1994 ; 25 : 256-69.
- Noyer JL, Dambier D, Grivet L, Lanaud C, Lagoda P. A saturated map of diploid banana, *Musa acuminata* (microsatellites, RFLP, Isozymes, RAPD and AFLP). *Plant and animal genome. V*, San Diego : 1997.
- Bakry F, Horry JP. Evidence for androgenesis in bananas. In : *Book of Poster Abstract. XIIIth EUCARPIA Congress*, July 06-11th 1992. Angers : 133-4.
- Escalant JV, Teisson C, Côte FX. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* sp.). In *vitro Cell Dev Biol* 1994 ; 30 : 181-6.
- Chatelet C. Régénération chez *Musa* sp. : recherche des conditions d'établissement de suspensions cellulaires d'espèces diploïdes et triploïdes. Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier II, 1992 ; 84 p.
- Marroquin CG, Paduscheck C, Escalant JV, Teisson C. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. In *vitro Cell Dev Biol* 1993 ; 29 : 43-6.
- Novak FJ, Afza R, van Duren M, Perea-Dallos M, Conger BV, Xiolang T. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA, AAA) and cooking (AAB) bananas. *Bio/Technology* 1989 ; 46 : 125-35.
- Dhed'a D, Dumortier F, Panis B, Vuylsteke D, De Langhe E. Plant regeneration in cell suspension cultures of cooking banana cv « Bluggoe » (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 1991 ; 46 : 125-35.
- Grapin A, Schwendiman J, Teisson C. Somatic embryogenesis in plantain banana. In *vitro Cell Dev Biol Plant* 1996 ; 32 : 66-71.
- Côte FX, Domergue R, Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C, Escalant JV. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA (cv. Grand Nain). *Physiologia Plantarum* 1996 ; 97 : 285-90.
- Panis B, Withers L, de Langhe E. Cryopreservation of *Musa* suspensions cultures and subsequent regeneration of plants. *Cryo-Letters* 1990 ; 11 : 337-50.
- Megia R, Haïcour R, Tizroutine S, Bui Trang V, Rossignol L, Sihachakr D, Schwendiman J. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv « Bluggoe » (*Musa* ssp. AAB group). *Plant Cell Reports* 1993 ; 13 : 41-4.
- Panis B, van Wauve A, Swennen R. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports* 1993 ; 12 : 403-7.
- Sagi L, Remy S, Panis B, Swennen R, Volckaert G. Transient gene expression in electroporated banana protoplasts (*Musa* spp. cv. « Bluggoe », ABB group) isolated from embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Reports* 1994 ; 13 : 262-6.
- Haïcour R, Rossignol L. Further information on protoplast regeneration and transformation in *Musa*. In : *Biotechnology applications for banana and plantain improvement*. San José, Costa Rica : INIBAP, 1993 : 60-2.
- Sagi L, Panis B, Remy S, Schoofs H, de Smet K, Swennen R, Cammue B. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardement. *Bio/Technology* 1995 ; 13 : 481-5.
- May GD, Afza R, Mason HS, Wiecko A, Novak FJ, Arntzen CJ. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technology* 1995 ; 13 : 486-92.

Résumé

Qu'avons-nous appris en analysant le génome d'*Arabidopsis thaliana* ?

R. HAÏCOUR, ET AL.

Depuis une dizaine d'années, le bananier a bénéficié, pour son amélioration, de la mise en œuvre de techniques « non conventionnelles » au travers de réseaux de recherches transnationaux. La propagation végétative par bourgeonnement adventif en culture *in vitro* est actuellement réalisée au stade industriel. On envisage un changement de technique, fondée sur l'embryogenèse somatique, afin de pourvoir à la fourniture massive de vitroplants tant pour les bananiers de consommation locale que pour les plantations industrielles.

Le développement de la culture des suspensions cellulaires embryogènes permet de disposer d'un matériel de choix pour la production en nombre de plantes (dont l'évaluation de la conformité au champ est en cours), pour la cryoconservation du germoplasme et pour l'amélioration génétique par les méthodes biotechnologiques. La faisabilité de la transformation génétique a été montrée chez les bananiers en 1992. L'obtention des premières plantes transgéniques en 1995 ouvre la voie à l'intégration chez les cultivars de type « plantain », ou chez les bananiers « industriels » de gènes d'intérêt agronomique tels que la résistance aux agents pathogènes à fort degré d'impact sur les récoltes. Des transformations génétiques visant la modification des systèmes de conservation ou de maturation des fruits sont déjà envisagées.

Le déploiement des biotechnologies permet aussi d'assister et de compléter l'amélioration génétique traditionnelle des bananiers qui vise, entre autres, la création de variétés triploïdes. Outre le recours aux marqueurs moléculaires pour mieux piloter les hybridations, l'obtention de protoplastes puis leur culture avec néo-formation de plantes ont été développées avec succès. En associant les produits de l'haplogénèse et des génomes diploïdes sélectionnés, ce nouvel outil permettra d'accéder, par le contournement des barrières reproductives inhérentes à cette espèce, à des combinaisons génétiques aboutissant à de nouvelles variétés triploïdes synthétiques par fusion de protoplastes. L'amélioration génétique des bananiers et les biotechnologies qui lui sont associées représentent un enjeu de taille puisqu'il s'agit d'atteindre à l'aube du XXI^e siècle un degré de sécurité alimentaire conséquent pour une production de fruits qui représentent la nourriture de base d'une population évaluée à plus de 400 millions de consommateurs.

Banana improvement through biotechnology-ensuring food security in the 21st century

R. HAICOUR, ET AL.

Banana and plantain are staple foods for nearly 400 million people. High-quality dessert bananas for export account for about 12% of the total production, whereas the overall production level is severely threatened by diseases and pests such as fungi (*Mycosphaerella* and *Fusarium*), nematodes and viruses. Biotechnology could provide efficient solutions to the problem of plant breeding limitations (sterility of most cultivars) and difficulties encountered with plant protection treatments (not economically feasible under low input sustainable systems, and detrimental to the environment). Over the past 10 years, there has been great progress in the development of banana and plantain biotechnologies. Micropropagation of banana is currently achieved industrially, and transgenic banana plants have already been obtained.

Due to the sterility of most cultivated edible banana varieties, plant propagation has been achieved traditionally by vegetative multiplication using naturally occurring plant off-shoots. Nowadays, 40 million micropropagated banana plants are produced annually and used as planting material. In vitro multiplication of banana is mostly performed through proliferation of vegetative meristems, which has the advantage of producing healthy homogeneous plants. The recent development of embryogenic suspension cultures has paved the way to future mass production of banana plants at low cost. Such suspension cultures can also be used for cryopreservation and as source material for genetic transformation. The agronomic conformity of banana plants produced from suspension cultures is currently being evaluated in the field.

Various figures inserted in the text illustrate the morphology of banana plants, breeding options currently being explored at the international level for banana improvement, and the somatic embryogenesis cycle through regeneration of cell suspensions initiated from male flower-derived embryogenic call.

Plant regeneration from protoplasts has been achieved. Protoplast fusion is particularly promising for banana improvement, as most cultivated varieties are related, triploid and sterile, while most genetic variability occurs in diploid fertile genotypes. Fusion between haploid plants and selected diploid genotypes could facilitate the production of new triploid bananas.

The first transgenic banana plants were produced in 1995 through particle bombardment of embryogenic suspension cultures. Recently, Agrobacterium-mediated transformation has also been achieved. This will now make it possible to introduce, into banana and plantain, valuable agronomic traits for pest and disease resistance, fruit maturation and storage.

In conclusion, at the onset of the 21st century, improvement of banana through biotechnology should help ensure food security by stabilizing production levels in sustainable cropping systems geared towards meeting domestic and export market demand.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 468-75.

Impact des travaux d'amélioration génétique et des biotechnologies sur les productions de bananiers pour les consommations locales en Afrique de l'Ouest et Afrique centrale

Erik Auboiron, R. Achard, K. Tomekpe, P. Noupadja, J. Tchango Tchango, Jean-Vincent Escalant

Les bananiers, plus particulièrement le sous-groupe AAB plantain, constituent la première ressource alimentaire du centre et de l'Ouest de l'Afrique. Ces cultures sont sévèrement attaquées par plusieurs agents pathogènes et ravageurs dont les champignons responsables des cercosporioses noire et jaune (*Mycosphaerella fijiensis* et *M. musicola*), des nématodes (*Rhadopholus similis*), le charançon noir (*Cosmopolites sordidus*) et différents virus. En conséquence, les rendements et la durée de vie des plantations sont faibles [1, 2]. Le maintien et éventuellement l'accroissement des surfaces plantées en bananiers nécessitent une quantité de matériel végétal difficile à réunir *via* les rejets produits dans les parcelles existantes. De plus, la médiocre qualité de ce matériel végétal contribue à la propagation des parasites. S'agissant des champignons, le seul moyen de lutte actuellement efficace implique des traitements chimiques hors de portée de la grande majorité des planteurs. La lutte contre les nématodes et les charançons postule également l'utilisation de pesticides, mais l'impact de ces agents peut être grandement réduit par la plantation de matériel végétal sain sur des terrains sains ou assainis [3, 4]. Pour les viroses, le seul moyen de

lutte connu à ce jour est l'éradication des plants atteints.

Par ailleurs, plusieurs hybrides résistants à la cercosporiose noire ont d'ores et déjà été créés et les autres agents pathogènes commencent à être considérés dans les programmes de création variétale pour lesquels

Glossaire

CRBP : Centre de recherche régionale sur bananiers et plantains.

INIBAP/IPGRI : International Network for Improvement of Banana and Plantain – International Plant Germplasm Resource Institute.

IRAD : Institut de recherches agricoles pour le développement.

PSCC : Projet semencier café cacao. GAPYSEM : Groupement agropastoral de Yaoundé – semences.

PGM2 : Projet Guinée maritime 2.

ONDR : Office national de développement rural.

PRSCC : Projet de relance du secteur café cacao, maintenant station de Dumasi.

CENAREST : Centre national de la recherche scientifique et technologique.

IGAD : Institut gabonais d'appui au développement.

ICRA : Institut centrafricain de recherche agronomique.

DGRST : Délégation générale de la recherche scientifique et technique.

E. Auboiron, R. Achard, K. Tomekpe, P. Noupadja, J. Tchango Tchango, J.-V. Escalant : Centre de recherche régionale sur bananiers et plantains, BP 832, Douala, Cameroun.

Tirés à part : E. Auboiron