

# Comportements *in vitro* de l'embryon isolé du bananier (*Musa species*).

J.V. ESCALANT et C. TEISSON\*

COMPORTEMENTS *IN VITRO* DE L'EMBRYON ISOLE DU BANANIER (*MUSA SPECIES*).

J.V. ESCALANT et C. TEISSON.

*Fruits*, Juin 1987, vol. 42, n° 6, p. 333-342.

RESUME - L'obtention rapide de clones de *Musa* à partir d'embryons isolés est réalisée sur un milieu défini enrichi en diverses auxines et cytokinines. L'addition de 6-benzylaminopurine et d'acide indol-3-acétique permet la formation de nombreux bourgeons à la base de la gemmule. La croissance de ces bourgeons est obtenue par transfert sur un milieu à faible teneur en cytokinine.

L'addition supplémentaire d'adénine sulfate permet la formation d'un très grand nombre de méristèmes après développement d'une protubérance à structure de tige (néotige).

Enfin, l'utilisation d'un agent à fort pouvoir auxinique (picloram) permet la formation d'un cal qui, après transfert sur un autre milieu, permet la régénération de bourgeons.

## INTRODUCTION

Les bananiers cultivés sont classés par SIMMONDS (1962) dans la section *Eumusa* du genre *Musa* faisant partie de l'ordre des Zingibérales. Les bananiers cultivés sont stériles. La multiplication des plants se fait par rejets. Les cultivars sont, à quelques exceptions près, triploïdes et résultent d'hybridations interspécifiques anciennes de diploïdes fertiles, regroupés selon SIMMONDS en deux grandes espèces : *Musa acuminata* (AA) et *Musa balbisiana* (BB). Dans les bananes farineuses dites à cuire, on peut distinguer deux groupes : les plantains allotriploïdes AAB et les Bluggoe allotriploïdes ABB (CHAMPION, 1963). Les bananes dessert à chair sucrée, triploïdes AAA, sont divisées principalement en deux sous-groupes : 'Cavendish' et 'Gros Michel'. Il existe par ailleurs plusieurs dizaines de diploïdes *acuminata* à fruits parthénocarpiques doux. Le cultivar le plus largement répandu en est la 'Figue sucrée' (ou Pisang mas).

Depuis quelques années, de nombreux chercheurs (MENENDEZ et SHEPHERD, 1975 ; KRIKORIAN et CRONAUER, 1984 ; BANERJEE et DE LANGHE, 1985 ;

ESSAD et DESSAUW, 1985) se sont intéressés à l'amélioration génétique du bananier. Celle-ci est orientée essentiellement vers l'obtention de nouveaux génotypes tri ou éventuellement tétraploïdes présentant aux maladies et parasites une résistance plus grande que les cultivars actuels. Aux voies classiques de création de tétraploïdes par croisement de diploïdes améliorés et de cultivars présentant une certaine fertilité femelle (P. ROWE, 1983), il est de plus en plus préféré de nouvelles stratégies (TEZENAS du MONTCEL, 1985 ; DESSAUW, 1985 ; BAKRY, 1984 ; TEISSON, 1985).

Celles-ci sont basées en grande partie sur les vitrométhodes utilisées directement (variants, protoplastes) ou en association avec des techniques d'hybridations sexuées (haplométhodes ; fécondation artificielle, doublement à la colchicine ...). Dans ce dernier contexte, la maîtrise parfaite de la germination des graines de bananier est un élément essentiel.

Les travaux relatifs à l'étude des graines et leur germination sont peu nombreux. Le stade de maturité du fruit au moment de la récolte, le temps et les conditions de stockage après la récolte, semblent déterminant pour la viabilité des graines (SIMMONDS, 1952, 1959). Le taux de germination diffère beaucoup d'un lot de graines à l'autre (SIMMONDS,

\* -IRFA/CIRAD - Laboratoire de culture *in vitro* - B.P. 5035 34032 MONTPELLIER CEDEX (France).

1952, 1959 ; STOVER, 1959). En 1962, STOZKY *et al.* présentent le premier article sur les techniques de scarification et de germination des graines en condition aseptique. Les graines entières de *Musa balbisiana* ne germent pas en conditions artificielles et aseptiques, à moins que ne soit effectuée une scarification mécanique de la graine qui met en contact le milieu gélosé et l'endosperme. Par contre des scarifications chimiques et thermiques se révèlent inefficaces. Ils mettent aussi en évidence la possibilité de faire germer l'embryon mature isolé. En 1961, M. W. MAC GAHAN publie une étude sur la morphologie de la graine de *Musa balbisiana*. Enfin, en 1963, BOUHARMONT étudie la formation des graines de *Musa acuminata* COLLA.

Cet article traite de premiers résultats obtenus par culture *in vitro* d'embryons isolés de *Musa*.

#### MATERIELS ET METHODES

Les graines utilisées sont récoltées à maturité du fruit. Elles proviennent de Guadeloupe et du Cameroun. Elles sont mises en agitation dans du Mercryl Laurylé pur pendant 15 minutes puis désinfectées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 8 p. 100 durant 20 minutes (STOZKY et col., 1962). Après trois rinçages à l'eau stérile, les embryons sont extraits et mis en attente dans une solution stérile d'eau sucrée à 60  $gl^{-1}$  de saccharose qui permet le maintien d'une forte pression osmotique (NORSTOG, 1961). Avant leur mise en culture, les embryons isolés (photo 1) sont désinfectés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1 degré chlorométrique (CRONAUER et KRIKORIAN, 1984) pendant 10 minutes, puis rincés à l'eau stérile sucrée.

Le milieu de germination (milieu G) se compose des éléments minéraux de MURASHIGE et SKOOG (1962) dont les macro-éléments sont dilués quatre fois, des vitamines de MOREL (1950), de 60  $gl^{-1}$  de saccharose, et de 7  $gl^{-1}$  d'Agar Agar Difco. Le pH est ajusté à 5,8 avant autoclavage. Il peut être enrichi en phytohormones : acide indole-3-acétique (AIA) ; picloram (acide 4 amino 3, 5, 6 trichloropicolinique) ; 6-benzylaminopurine (BAP) et

kinétine. Toutes les cultures sont initiées à l'obscurité à 27°C.

Le milieu de croissance (milieu C) se distingue du milieu de germination par la non-dilution de la solution de M.S. et la teneur en saccharose qui est abaissée à 40  $gl^{-1}$

Les études histologiques sont réalisées sur des échantillons préalablement fixés dans une solution (F.A.A.) constituée d'un mélange d'éthanol 95 p. 100 (80 ml), d'acide acétique (10 ml) et de formol (10 ml), puis ils sont déshydratés, imprégnés de paraffine et inclus dans un bloc de paraffine. Des coupes de 5 à 12 microns sont réalisées au microtome à entraînement manuel. Après déparaffinage, les coupes sont alors colorées, soit à l'hématoxyline de Régaud : les parois cellulaires et les noyaux apparaissent en brun, soit au P.A.S. (Périodic Acid-Schiff), les parois et les substances de réserve (amidon) apparaissent alors en rouge.

#### RESULTATS

##### La germination de la graine et de l'embryon isolé.

Les taux de germination étant très variables d'un lot de graines à l'autre (SIMMONDS, 1952, 1959 et STOVER, 1959) ceux-ci sont testés au préalable. Les graines sont placées sur un mélange (1/1) très humide de terreau et de vermiculite dans une enceinte chauffée à 30 °C en lumière naturelle. Des expériences préliminaires ont en effet montré que la lumière artificielle semblait inhiber la germination. Cette observation peut être rapprochée de celle faite par L.K. THOMPSON et col., 1985 sur *Arachis hypogea* L. qui ont mis en évidence l'inhibition par certaines longueurs d'ondes de la germination de l'embryon lorsqu'il reste attaché aux tissus de l'ovule mais pas lorsqu'il est isolé. Ces auteurs émettent l'hypothèse de l'intervention du phytochrome localisé dans les téguments ovulaires. Dans les conditions *in vitro*, la nature de l'éclairage ne semble pas influencer le développement de l'embryon isolé, qui se comporte aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité.

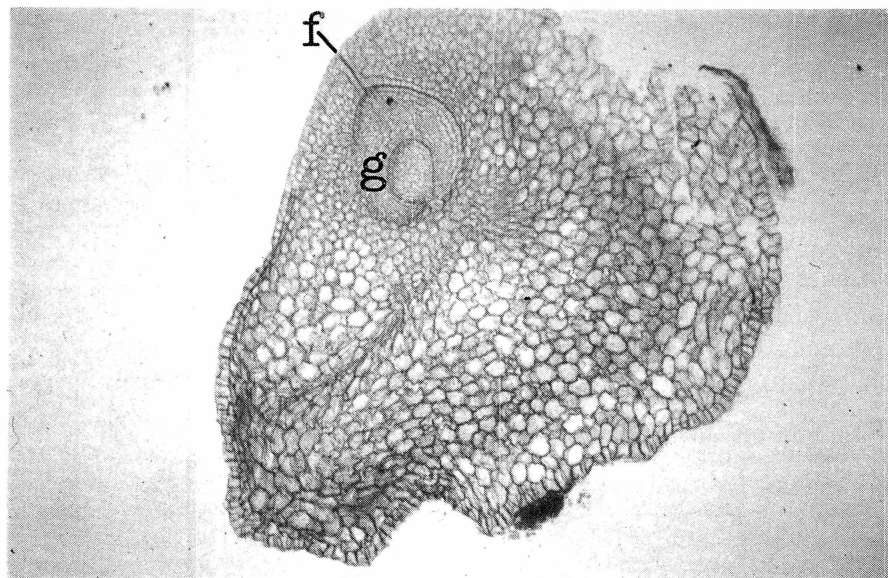


Photo 1 - Coupe dans un embryon excisé de *M. balbisiana*. Présence de la gemmule (g) et de la fente cotylédonaire (f).

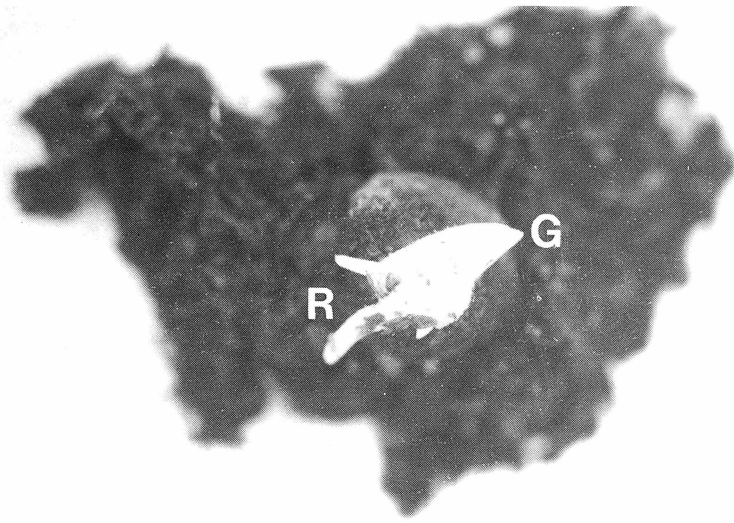
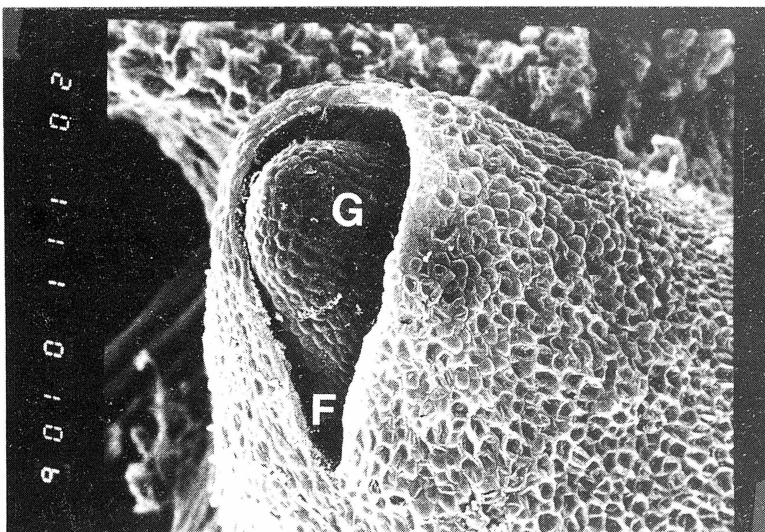
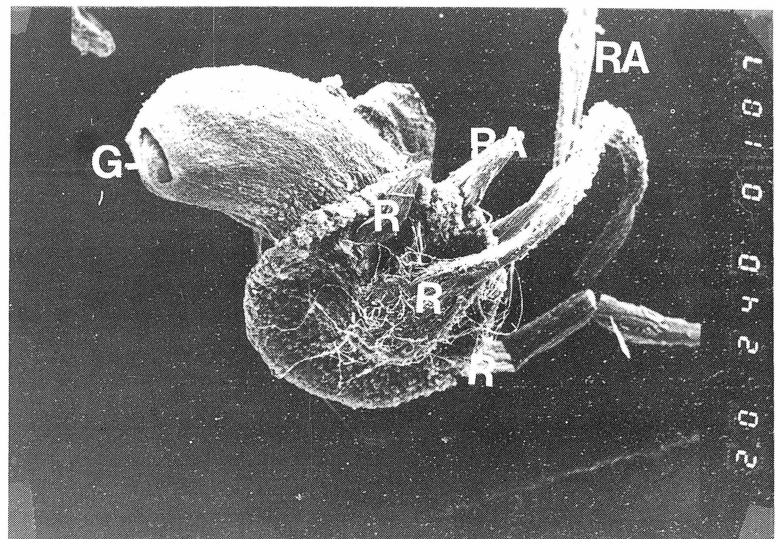


Photo 2 - Germination *in vivo* d'une graine de *M. balbisiana*. Les trois racines embryonnaires sont présentes (R), la gemmule (G) émerge de la fente cotylédonnaire (F). Deux racines adventives sont déjà présentes (RA).



*In vivo*, la succession des événements est la suivante : soulèvement du micropyle (figure 1), MAC GAHAN (1961), apparition sur le plateau racinaire et développement rapide des trois racines embryonnaires et enfin émergence de la gemmule (photo 2).

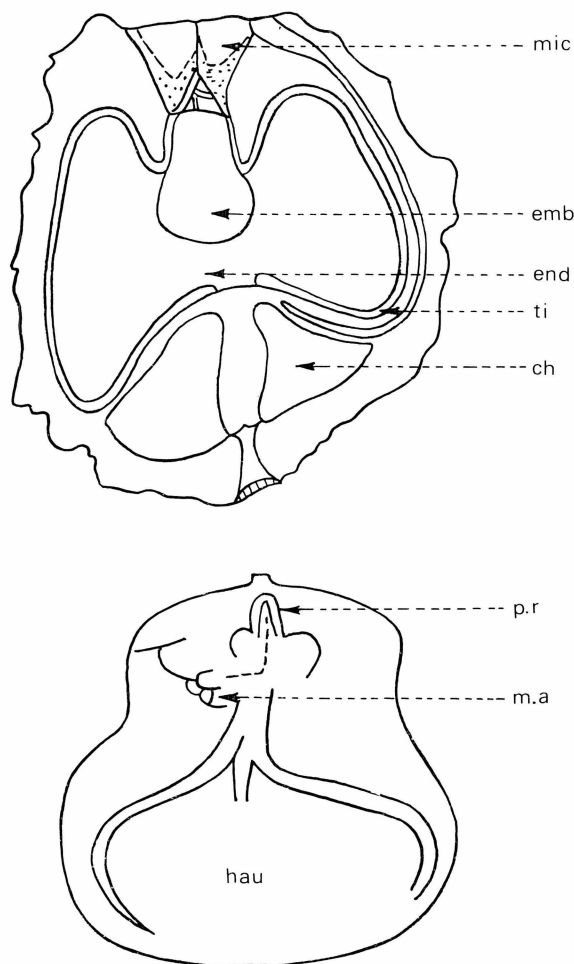


FIG. 1 • (MAC GAHAN, 1961). COUPE SCHEMATIQUE D'UNE GRAINE ET D'UN EMBRYON DE MUSA BALBISIANA.

mic = micropyle, emb = embryon, end = endosperme, ti = teguments internes, ch = chalaze, p.r = primordium racinaire, m.a = méristème apical, hau = haustorium.

*In vitro*, sur le milieu G, après quatre ou cinq jours de culture, l'embryon isolé brunit. Ce phénomène traduit le réveil de l'activité des phénoloxydases. Il est la première manifestation de la viabilité et de la germination *in vitro*. Les embryons restés blancs ne germent jamais et l'estimation de l'activité phénoloxydasique pourrait donc être un test précoce du pouvoir germinatif des embryons. La germination proprement dite intervient après 8 à 10 jours de culture et se traduit par le développement de la gemmule (photo 3). Ce n'est qu'après 15 à 20 jours qu'apparaît la première racine. L'analyse histologique de telles plantules montre qu'il s'agit de racines adventives et non du développement des racines embryonnaires.

Il y a donc une différence entre la germination *in vivo* des graines et le développement *in vitro* de l'embryon

isolé. Les pôles racinaires, d'après des coupes histologiques, sont pourtant toujours présents lors de la mise en culture de l'embryon. Ils se nécrosent donc après quelques jours de culture et ce quelles que soient les conditions d'expérience.

#### *Action de diverses substances stimulantes.*

Nous avons testé 14 lots en notre possession : 6 lots de diploïdes *acuminata* (AA), 1 lot hybride (AB) de *Musa acuminata* par *Musa balbisiana* et 7 lots de *Musa balbisiana*. Les taux de germination *in vivo* et *in vitro* sont identiques (tableau 1).

Les lots AA ont un très faible pourcentage de germination. Pour améliorer ce comportement nous avons étudié l'action sur la germination de diverses substances : Gibberelline GA3 à 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> (MULLINS et SRINIVASAN, 1976 ; THOMAS et SCOTT, 1985) ; AIA à 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> ; hydrolysat de caséine à 500 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> (BAKRY, 1984) ; charbon actif à 50, 100 et 1 000 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> (GUPTA *et al.*, 1984 ; ASSY BAH, 1986), et différentes doses de saccharose soit 30, 60 et 120 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> (NORSTOG, 1961, 1965).

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 2. Aucun des traitements n'a permis d'améliorer les résultats représentés dans le tableau 1.

#### *Influence de la durée de stockage.*

Un nouveau test a été effectué après une conservation de 8 mois, afin de voir si la durée du stockage avait une quelconque influence sur le pourcentage de germination de tous nos lots de graines (SIMMONDS, 1952, 1959). Il ressort de cette expérience que les lots BB germent toujours à 80 p. 100. Parmi les lots AA, le lots AA5 présente 60 p. 100 de graines ou embryons isolés germants. Ce lot aurait donc accru son pouvoir germinatif avec le temps de stockage.

#### *Prolifération à partir d'un embryon isolé.*

L'enrichissement du milieu G en phytohormones (BAP 5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> et AIA 2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>), entraîne après 8 jours de culture la sortie d'une gemmule hypertrophiée. Environ 15 jours plus tard, quelques bourgeons apparaissent à la base de la gemmule (photo 4) Après un délai de trente jours une touffe compact formée de nombreux apex caulinaires s'est formée. Après deux cultures successives de 20 jours chacune sur le milieu C, chaque embryon germé donne en moyenne 15 plants (photo 5). Chaque plant peut ensuite être multiplié par la néoformation de nombreux bourgeons après mise en culture sous la forme d'un demi bananier sur le milieu C enrichi en BAP 5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> et AIA 2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> (CRONAUER et KRİKORIAN, 1984 ; BOWER et FRASER, 1982 ; BAKRY, 1984). Un clone d'une centaine d'individus peut être ainsi obtenu à partir d'un seul embryon zygotique.

Ce genre de résultat pourrait être très utile pour appuyer un programme d'amélioration classique d'hybridations et de sélections au champ. Le passage *in vitro* d'em-



TABLEAU 1 - Pourcentages comparés de germination *in vivo* et *in vitro* de différents lots. Résultats obtenus sur trois répétitions de 50 individus.

| Génotype du lot | N° du lot | p. 100 de germination <i>in vivo</i> après 10 jours | p. 100 de germination <i>in vitro</i> après 15 jours |
|-----------------|-----------|---|--|
| AA              | 1         | 0   | 0  |
| AA              | 2         | 0   | 0  |
| AA              | 3         | 0   | 0  |
| AA              | 4         | 2   | 2  |
| AA              | 5         | 0   | 0  |
| AA              | 6         | 2   | 0  |
| AB              | 7         | 84  | 80   |
| BB              | 8         | 80  | 79   |
| BB              | 9         | 78  | 78   |
| BB              | 10        | 90  | 90   |
| BB              | 11        | 70  | 72   |
| BB              | 12        | 82  | 80   |
| BB              | 13        | 62  | 62   |
| BB              | 14        | 80  | 82   |

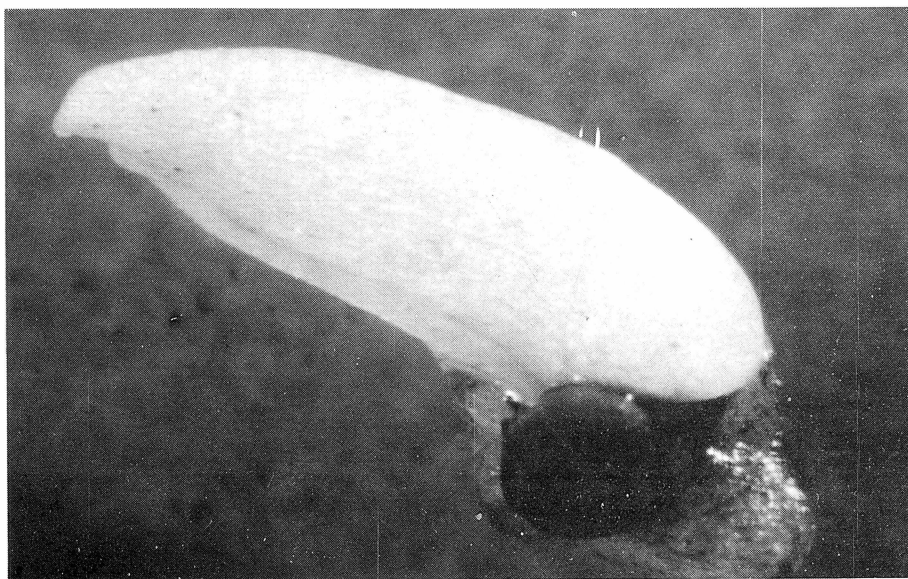


Photo 3 - Germination *in vitro* d'un embryon de *M. balbiana*.

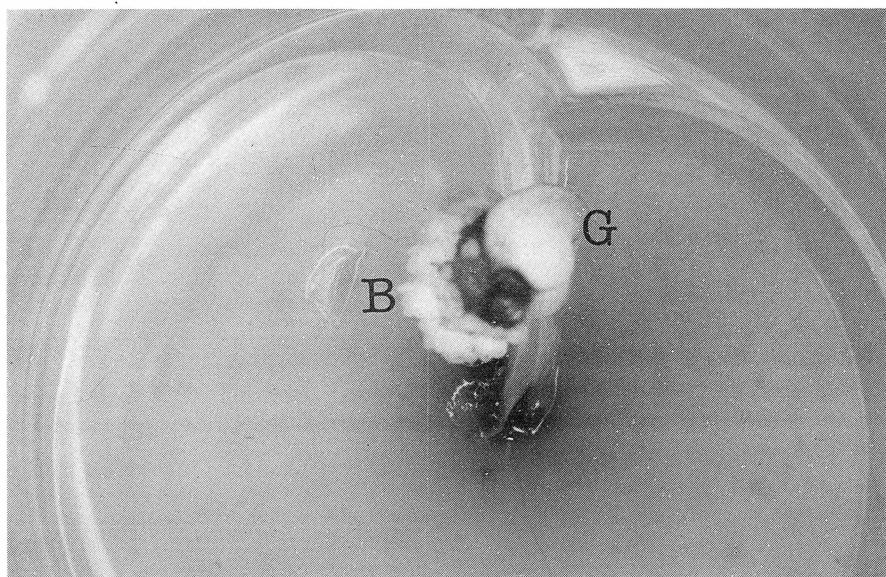


Photo 4 - Embryon isolé proliférant. On observe la gemmule hypertrophiée (G) et de nombreux bourgeons (B) à la base.

TABLEAU 2 - Pourcentages de germination d'embryons isolés obtenus sur le milieu G enrichi en diverses substances de croissance. Résultats obtenus sur deux répétitions de 50 individus. Le lot BB13 sert en quelque sorte de témoin d'une germination possible sur un tel milieu.

| Substances testées \ Lot et génotype           | AA1 | AA2 | AA3 | AA4 | AA5 | AA6 | BB13 |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Ga3  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 65   |
| CH   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 2   | 62   |
| AIA  | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 2   | 60   |
| Charbon actif (mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |     |     |      |
| 50   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 2   | 62   |
| 100  | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 2   | 62   |
| 1 000  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 61   |
| Saccharose (gl <sup>l</sup> <sup>-1</sup> )    |     |     |     |     |     |     |      |
| 30   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   | 40   |
| 60   | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 2   | 60   |
| 120  | 0   | 0   | 0   | 2   | 0   | 2   | 62   |

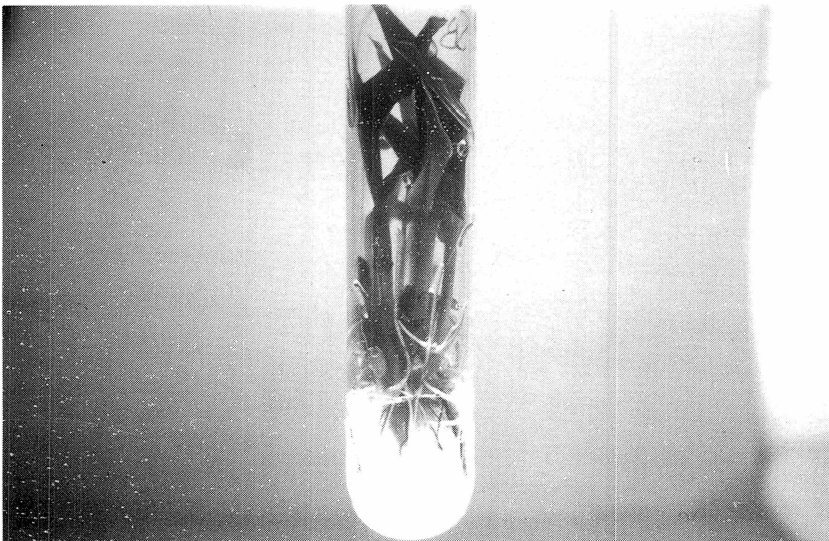


Photo 5 - Croissance et enracinement des bourgeons obtenus sur embryons proliférants.

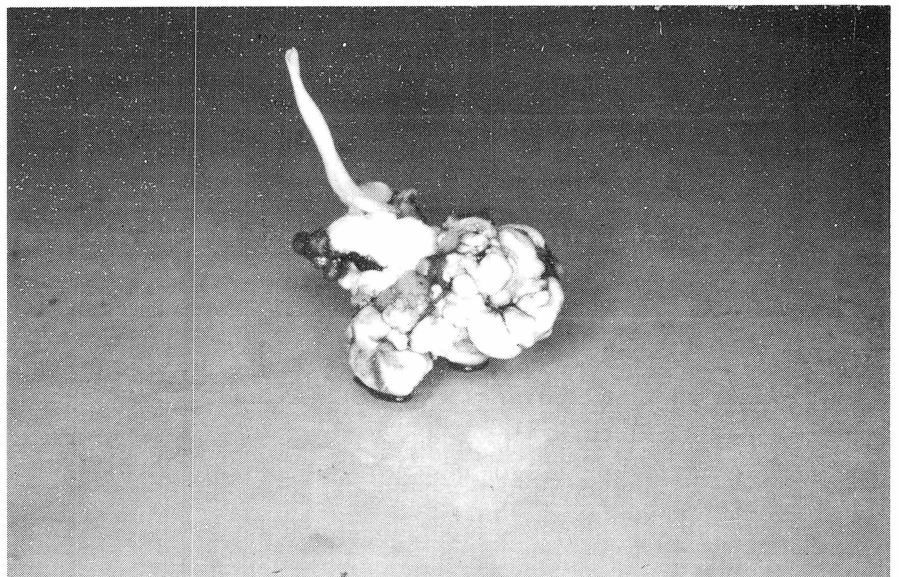


Photo 6 - «Néotige» formée à la base de la gemmule, lorsque l'embryon est mis à germer sur un milieu enrichi en adénine sulfate.

bryons isolés devrait permettre l'obtention rapide d'hybrides clonés et la réalisation de tests précoces sur la valeur agronomique (résistances aux maladies ...) sans risque de perte du génotype créé.

#### Obtention de «néotige» à partir d'embryon isolé.

La présence dans le milieu G de BAP 5 mg l<sup>-1</sup>, d'AIA 1 mg l<sup>-1</sup> et d'adénine sulfate à 150 mg l<sup>-1</sup> (NITSCH et col., 1967 ; SETH MANTE et HERBERT B. TEPPER, 1983) permet après 30 jours de culture d'observer à la base de la gemmule la formation d'une structure plus ou moins globuleuse dont la surface est couverte de très nombreux apex (photo 6). L'analyse histologique de cette protubérance appelée «néotige» (TEISSON, publication à paraître) montre une structure de tige bulbeuse analogue à celle du bananier adulte avec zone médullaire et zone corticale, très riche en substances de réserves (amidon). Son développement est assuré par un repiquage mensuel sur le même milieu. Au cours des subcultures, des plantes peuvent être isolées et mises en croissance sur le milieu C. De plus lorsque cette structure atteint des dimensions trop importantes, elle peut être fragmentée. Chaque fragment, repiqué sur le milieu qui lui a donné naissance, redonnera une nouvelle «néotige». Le phénomène peut être ainsi maintenu pendant plusieurs années.

Cette structure rappelant un peu celle des protocormes d'orchidées a pu être observée par d'autres auteurs sur d'autres monocotylédones : NORSTOG en 1965 sur orge obtient à partir d'embryons immatures un tissu ressemblant au protocorme, régénérant apex et racines. MAPES en 1973 obtient les mêmes résultats à partir de bourgeons d'ananas. ABO EL NIL et ZETTLER en 1976 décrivent la formation d'une telle structure chez *Colocasia esculenta* directement à partir de bourgeons ou indirectement sur un cal. DE MAGGIO et WETMORE en 1961 obtiennent aussi une structure rappelant un protocorme à partir d'embryons immatures de *Todea barbara* (fougère).

La conformité des plants obtenus sur «néotige» est en cours d'étude. Toutefois, même s'il n'est pas créé de variabilité, ces plants peuvent présenter un intérêt tout particulier pour des manipulations *in vitro*. En effet, il est classiquement admis que celles-ci sont plus aisées sur du matériel jeune ; or les bananiers formés sur ces «néotiges» présentent un apex conique que l'on ne retrouve

que dans les plantes issues de semis (BARKER et STEWARD, 1962).

#### Essai de callogenèse à partir d'embryon zygotique isolé.

Des travaux de callogenèse sur bananier à partir d'organes végétatifs et inflorescentiels ont déjà été réalisés : MOHAN RAM et STEWARD en 1964 ; SRINIVASA RAO et col., en 1982. BOMMART en 1984 obtient des cals sur tige, gaine et feuille ; BAKRY en 1984 initie des cals à partir d'apex inflorescentiels, BAUDOIN en 1985 teste l'effet de certaines toxines sur des cals de tiges ; JARRET en 1985 obtient des cals à partir de gaines et enfin TEISSON en 1986 (publication à paraître) régénère des apex végétatifs sur des cals de tiges isolés et repiqués pendant plusieurs mois.

Les difficultés à obtenir une organogenèse de plant sur cal de *Musa* se retrouvent avec d'autres monocotylédones, et plus particulièrement avec les graminées. Cependant les premières formations de cals organogènes et mises au point de l'embryogenèse somatique ont été réalisées à partir d'embryons matures ou immatures : BREIMAN en 1985 sur *Hordeum spontaneum* et *bulbosum*. THOMAS et SCOTT en 1985 sur *Hordeum vulgare* et RINES et LUKE (1985) sur *Avena sativa*.

Il a donc paru intéressant de tester callogenèse et néoformation sur embryons isolés de bananier.

Le milieu est enrichi en différentes auxines ou agents à fort pouvoir auxinique. Les résultats sont regroupés dans le tableau 3. Chaque traitement comprend la mise en culture de 24 embryons et se répète deux fois. L'utilisation du 2,4-D et 2,4,5-T ne permet pas d'obtenir une callogenèse viable après 15 jours de culture ; très vite les petits cals formés se nécrosent en présence ou non de charbon actif à 100 mg l<sup>-1</sup>. Seule l'utilisation du picloram à 2 mg l<sup>-1</sup> (N.P. KEFFORD et D.H. CASO, 1966 ; EISENGER et D.J. MORRE, 1970 ; HUBERT DULIEU et col., 1972) permet d'obtenir des cals viables au-delà de 15 jours de culture (photo 7). Ceux-ci sont fragmentés après deux mois de croissance puis transférés sur le milieu C enrichi en picloram à 1 mg l<sup>-1</sup>. Après un autre mois de culture les cals sont repiqués sur le milieu C additionné de BAP 5 mg l<sup>-1</sup> et d'AIA à 2 mg l<sup>-1</sup> sur lequel ils se nécrosent, au profit d'une régénération de plusieurs bourgeons (photo 8) qui, individualisés et repiqués sur le milieu

TABLEAU 3 - Evolution au cours du temps de la callogenèse à partir d'embryon zygotique de bananier en fonction des hormones utilisées.

| Nature des hormones utilisées<br>(mg l <sup>-1</sup> ) | Callogenèse<br>p. 100 | Callogenèse viable après 15 jours<br>de culture (p. 100) | Callogenèse viable après 30 jours de<br>culture (p. 100) |
|--|-----------------------|--|--|
| 245-T (1)  | 0                     | 0  | 0  |
| 24-D (1)   | 40                    | 0  | 0  |
| 24-D (2)   | 50                    | 0  | 0  |
| Picloram (1)   | 4                     | 0  | 0  |
| + 245-T (1)  |                       |  |  |
| Picloram (0,5)   | 4                     | 0  | 0  |
| + 245-T (0,5)  |                       |  |  |
| Picloram (2)   | 60                    | 50   | 40   |



Photo 7 - Cal obtenu par mise en germination d'embryon excisé, sur un milieu enrichi en picloram.

C sans hormone, se développent pour donner des plantes entières (photo 9).

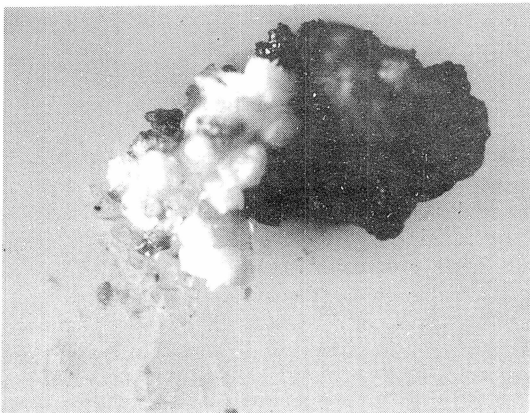


Photo 8 - Régénération de bourgeons sur cal nécrosé.

L'étude histologique du cal au cours de sa formation montre dans un premier temps une désorganisation totale des structures embryonnaires : la structure gemmulaire et les pôles racinaires disparaissent. Le cal est formé d'un ensemble de cellules méristématiques actives. Au cours de son vieillissement, sa structure interne change (photo 10). Il est alors formé d'un parenchyme totalement différencié (cellules larges et vides), de quelques zones vascularisées et d'un tissu parenchymateux constitué de cellules à grosse vacuole dont le noyau petit est repoussé à la périphérie. Encore capables de se diviser, ces dernières assurent une croissance lente du cal sur le milieu C enrichi en picloram.

Des cals ainsi maintenus en culture durant 18 mois, ont été capables de régénérer des pousses végétatives après fragmentation et repiquage sur le milieu C enrichi en BAP à  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  (photo 11).

#### DISCUSSION - CONCLUSION

La culture *in vitro* d'embryons matures isolés de bananier apparaît ici comme un outil utilisable dans le cadre d'hybridations interspécifiques lorsque certains croisements se révèlent fertiles. Elle peut permettre en effet de tester précocement de la valeur agronomique du matériel cloné obtenu, sans risque de perte des génotypes créés.

D'autre part, elle peut aider à la mise au point et au test rapide de différents traitements (prolifération, callogenèse et obtention de néotiges) qui pourront être ensuite appliqués à d'autres parties du bananier.

Elle est enfin le premier stade d'une longue recherche qui pourrait amener dans un premier temps à la gynogenèse et plus tard à la fécondation *in vitro*. La fertilisation *in vitro* d'ovules a déjà été réalisée chez de nombreuses familles de plantes. Chez le bananier, elle pourrait permettre d'obtenir plus d'hybrides qu'*in vivo* et, pourquoi pas, des hybrides impossibles à créer par les méthodes classiques (SHEPHERD, 1983).

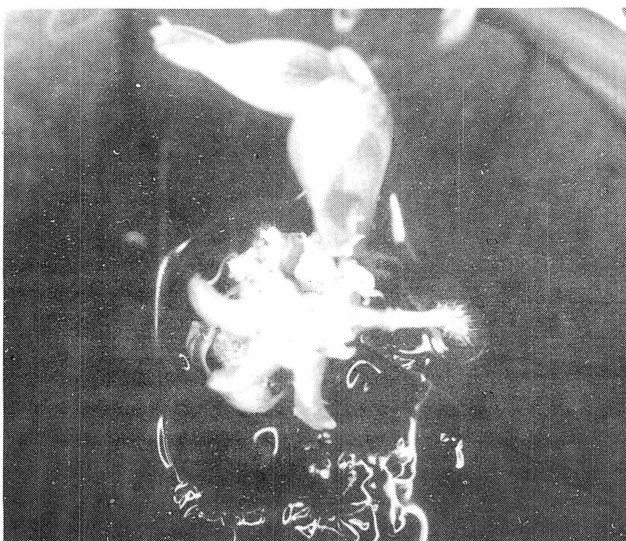


Photo 9 - Evolution sur le milieu C des bourgeons néoformés.



Photo 10 - Histologie d'un fragment de cal, obtenu par mise en culture d'un embryon zygotique isolé sur un milieu enrichi en picloram.

c.p.a. : cellules parenchymateuses encore actives  
m.m. : massifs méristématiques témoignant d'une organogenèse en cours (x 80).

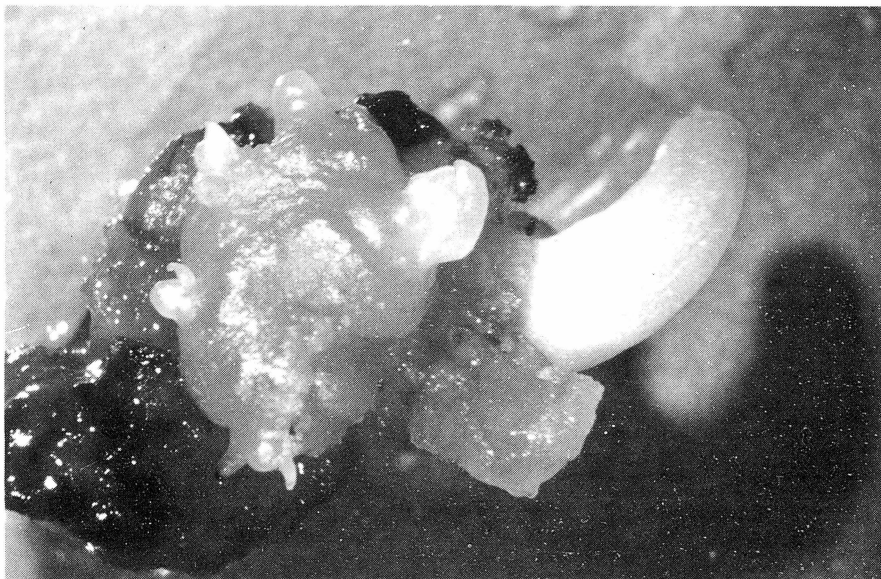
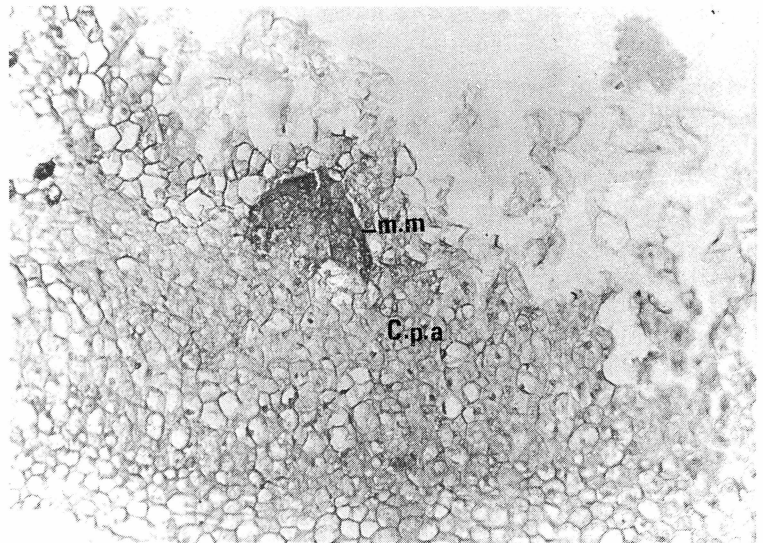


Photo 11 - Organogenèse végétative obtenue sur un cal d'embryon zygotique âgé de 18 mois, après repiquage sur le milieu C enrichi en BAP à 0,5 mg l<sup>-1</sup>.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ABO EL NIL (M.M.) et ZETTLER (F.W.). 1976.  
Callus initiation and organ differentiation from shoot tip cultures of *Colocasia esculenta*.  
*Plant. Sci. Lett.*, 6, 401-408.
- ASSY BAH (B.). 1986.  
Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotiers.  
*Oléagineux*, 41 (7), 321-328.
- BAKRY (F.). 1984.  
Application des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration du bananier (*Musa sp.*).  
Thèse de 3ème cycle, Université de Paris XI, Centre d'Orsay, 130 p.
- BANERJEE (N.) et 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. Reports.*, 4 (6), 351-354.
- BARKER (W.G.) et STEWARD (F.C.). 1962.  
Growth and development of the banana - Plant I.  
The growing regions of the vegetative shoot.  
*Annals of Botany N.S.*, 26 (103), 390-411.
- BAUDOIN (C.). 1985.  
Recherche d'un test précoce de sélection pour la résistance du bananier (*Musa sp.*) à la maladie des raies noires (*Mycosphaerella fijiensis*).  
Thèse, Orsay, Paris, 173 p.
- BOMMART (P.). 1984.  
Essais de callogenèse sur tissus de bananiers (*Musa sp.*).  
DEA - Laboratoire culture *in vitro* - CIRAD Montpellier, 79 p.
- BOUHARMONT (J.). 1963.  
Evolution de l'ovule fécondé chez *Musa acuminata* Colla. Subsp. *burmannica* SIMMONDS.  
Travaux biologiques de l'Institut J.B. CARNOY, Louvain (Belgique) n° 84.
- BOWER (J.P.) et FRASER (C.). 1982.  
Shoot tip culture of Williams' bananas.  
*Subtropica*, 3 (6), 13-16.
- BREIMAN (A.). 1985.  
Plant regeneration from *Hordeum spontaneum* and *Hordeum bulbosum*- Immature embryo derived calli.  
*Plant. Cell. Reports.*, 4 (2), 70-73.
- CHAMPION (J.). 1963.  
Le bananier.  
Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, II, 25-49.



- CRONAUER (S.S.) et KRİKORIAN (A.D.). 1984.  
Multiplication of *Musa* from excised stem tips.  
*Annals of Botany*, 53, 321-328.
- DE MAGGIO (A.E.) et WETMORE (R.M.). 1961.  
Morphogenetic studies on the fern *Todea barbara*.  
III.- Experimental embryology.  
*Am. J. Bot.*, 48 (7), 551-565.
- DESSAUW (D.). 1985.  
L'hybridation dans l'amélioration du bananier.  
*Réunion annuelle IRFA*, Doc. BA n° 15.
- DULIEU (M.M.), VALLE (J.C.) et MARTIN (C.). 1972.  
Quelques effets de l'acide 3,5,6-trichloropicolinic (picloram)  
sur les tissus de *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* n.c. en culture *in vitro*.  
*C.R. Acad. Sc. Paris, Série D*, 274, 2574-2577.
- EISENGER (W.R.) et MORRE (D.J.). 1971.  
Growth regulating properties of picloram 4 amino 3,5,6-trichloro-  
picolinic acid.  
*Can. J. Bot.*, 49, 889-897.
- ESSAD (S.) et DESSAUW (D.). 1985.  
Le rôle de la cytogénétique dans les programmes d'amélioration  
génétique du bananier.  
*Réunion annuelle IRFA*, Doc. BA n° 29.
- GUPTA (P.K.), KENDURKAR (S.V.), KULKARNI (V.M.),  
SHIRGURKAR (M.V.) et MASCARENHAS (A.F.). 1984.  
Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of  
coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*.  
*Plant. Cell. Reports*, 3, 222-225.
- JARRET (R.L.), FISHER (J.B.) et LITZ (R.E.). 1985.  
Organ formation in *Musa* tissue cultures.  
*J. Plant. Physiol.*, 121, 123-130.
- KEFFORD (N.P.) et CASO (D.H.). 1966.  
A potent auxin with unique chemical structure 4 amino 3,5,6-  
trichloropicolinic acid.  
*Bot. Gaz.*, 127 (2-3), 159-163.
- KRIKORIAN (A.D.) et CRONAUER (S.S.). 1984.  
Aseptic culture techniques for banana and plantain improvement.  
*Economic Botany*, 38 (3), 322-331.
- MAC GAHAN (M.W.). 1961.  
Studies on the seed of banana. I.- Anatomy of the seed and  
embryo of *Musa balbisiana*.  
*Am. J. of Bot.*, 48, 230-238.
- MAPES (M.O.). 1973.  
Tissue culture of bromeliads.  
*Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc.*, 23, 47-55 (4A 45 5448).
- MENENDEZ (T.) et SHEPHERD (K.). 1975.  
Breeding new bananas.  
May-June, 104-111.
- MOHAN RAM (M.Y.) et STEWARD (F.C.). 1964.  
The induction of growth in explanted tissue of the banana fruit.  
*Can. J. Bot.*, 42, 1559-1579.
- MOREL (G.). 1950.  
Sur la culture des tissus de deux monocotylédones.  
*C.R. Acad. Sc. Paris*, 230, 1099-1101.
- MULLINS (M.G.) et SRINIVASAN (C.). 1976.  
Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grape-  
vine (CV Cabernet - Sauvignon) by apomixis *in vitro*.  
*J. Exp. Bot.*, 27 (100), 1022-1030.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.  
A revised medium for rapid growth and bio assays with tissue  
cultures.  
*Physiol. Plantarum.*, 15, 473-497.
- NITSCH (J.P.), NITSCH (C.), ROSSINI (L.M.E.) et BUI DANG HA  
(D.). 1967.  
The role of adenine in bud differentiation.  
*Phytomorph.*, 17, 446-453.
- NORSTOG (K.). 1961.  
The growth and differentiation of cultured Barley embryos.  
*Am. J. Bot.*, 48, 876-884.
- NORSTOG (K.). 1965.  
Development of cultured Barley embryos. I.- Growth of  
0,1-0,4 mm embryos.  
*Am. J. Bot.*, 52 (6), 538-546.
- RINES (H.W.) et LUKE (H.H.). 1985.  
Selection and regeneration of toxin-intensive plants from tissue  
cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium  
victoriae*.  
*Théor. Appl. Genet.*, 71, 16-21.
- ROWE (P.). 1983.  
L'hybridation pour l'amélioration des plantains et autres bananes  
à cuire.  
*Fruits*, 38 (4), 256-260.
- SETH MANTE et HERBERT B. TEPPER. 1983.  
Propagation of *Musa textilis* NEE plants from apical meristem  
slices *in vitro*.  
*Plant. Cell. Tissue Organ Culture*, 2, 151-159.
- SHEPHERD (K.). 1983.  
Translation of an invited paper «Melhoramento Genética de  
Bananeira»,  
presented in portuguese at the 1er Simposio sobre bananeira,  
Prata, in the State of Esperitu Santo, Brazil.
- SIMMONDS (N.W.). 1952.  
The germination of banana seeds.  
*Trop. Agric. Trin.*, 29, 2-16.
- SIMMONDS (N.W.). 1959.  
Experiments on the germination of banana seeds.  
*Trop. Agric. Trin.*, 36, 259-274.
- SRINIVASA RAO (N.K.), CHACKO (E.K.), DORE SWAMY (R.)  
and NARAYANASWAMY (S.). 1982.  
Induction of growth in explanted inflorescence axis of banana.  
*Current Sci.*, 51 (13), 666-667.
- STOVER (R.H.). 1959.  
A rapid and simple pathogenicity test for detecting virulent  
clones of *Fusarium oxysporum* f. *cubeense* using seedlings of  
*Musa balbisiana*.  
*Nature*, 184, 1591-1592.
- STOZYK (G.), ELSIE (A.) COX et ROGER D. GOOS, 1962.  
Seed germination studies in *Musa*.  
I.- Scarification and aseptic germination of *Musa balbisiana*.  
*Am. J. bot.*, 49 (5), 515-520.
- TEISSON (C.). 1985.  
La culture *in vitro* comme voie d'amélioration génétique et  
de multiplication conforme.  
*Réunion annuelle IRFA*, Doc. BA n° 50.
- TEZENAS DU MONTCEL (H.). 1985.  
Ressources génétiques, taxonomie, hybridation.  
*Réunion annuelle IRFA*, Doc. BA n° 2.
- THOMAS (M.R.) et SCOTT (K.). 1985.  
Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated  
from immature embryos and immature inflorescences of *Hordeum  
vulgare*.  
*J. Plant. Physiol.*, 121, 159-169.
- THOMPSON (L.K.), MEIRA ZIU et DEITZER (G.F.). 1985.  
Photocontrol of peanut (*Arachis hypogea* L.) embryo and ovule  
development *in vitro*.
- USHA RAO (I.), RAMANUJA RAO (I.V.) et VIBHA NARANG.  
1985.  
Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo  
*Dendrocalamus strictus*.  
*Plant. Cell. Reports*, 4, 191-194.

