

Analyse des capacités de callogenèse et d'organogenèse obtenues à partir de différents tissus de Bananiers (*Musa* sp., Musacées).

F. BAKRY et L. ROSSIGNOL*

ANALYSE DES CAPACITES DE CALLOGENESE ET D'ORGANOGENESE OBTENUES A PARTIR DE DIFFERENTS TISSUS DE BANANIERS (*MUSA* SP., MUSACEES).

F. BAKRY et L. ROSSIGNOL.

Fruits, Nov. 1985, vol. 40, n° 11, p. 697-708.

RESUME - Des tissus végétatifs et reproducteurs de bananiers (en particulier de cultivars triploïdes (AAA) du groupe «Cavendish») sont mis en culture *in vitro* sur divers milieux axéniques. Bien qu'ils puissent pratiquement tous, à l'obscurité, donner des cals, ceux-ci sont souvent fortement limités par un noircissement intense des milieux et des tissus eux-mêmes entraînant la mort de ces derniers.

A partir de tissus floraux ou inflorescentiels des cals ont, cependant, pu être obtenus, surtout en présence de 2,4.D, mais sur ces cals,

après repiquage, aucune organogenèse, qu'elle soit caulinaire ou racinaire, n'a été notée.

Les explants foliaires, placés sur des milieux avec 2, 4.D et 2, 4, 5.T, fournissent aussi des cals qui proviennent de la division de cellules appartenant, généralement, au parenchyme périvasculaire. Ces cals, sur ces milieux, ont pu être entretenus, indifféremment à la lumière et à l'obscurité, et n'ont donné, pour l'instant et dans nos conditions de culture, que des néoformations racinaires.

D'autres cals, apparus à partir de fragments d'apex inflorescentiels et sur des milieux sans 2,4.D ni 2, 4, 5.T, constituent un matériel plus intéressant puisqu'ils permettent de s'affranchir des problèmes de noircissement et de nécrose. Aussi, sont-ils capables, sur des milieux appropriés [MSb+AIA+BAP (à 2 mg/l) par exemple], et après plusieurs repiquages, de manifester une organogenèse caulinaire qui relève de deux modalités différentes : l'embryogenèse somatique et la néoformation de bourgeons.

INTRODUCTION

Les techniques de culture *in vitro* ont pris, ces dernières années, une place importante en Amélioration des Plantes du fait qu'elles permettent, d'une part, la propagation clonale et accélérée d'une structure génétique intéressante, mais aussi et surtout, l'élargissement de la variabilité autrement que par la voie sexuée. Le succès de ce deuxième objectif repose sur la possibilité, non encore obtenue chez certaines plantes (FLICK et coll., 1984), de produire des individus néoformés qui peuvent être différents du végétal de départ lorsque leur initiation passe par une étape plus ou moins importante de prolifération anarchique. Il serait particulièrement intéressant d'arriver à ce résultat chez les

Bananiers où la stérilité plus ou moins complète des cultivars utilisés limite très fortement les possibilités d'amélioration par tous les travaux de sélection classique (KRIKORIAN et CRONAUER, 1984).

A l'heure actuelle, il n'y a que peu d'auteurs qui, à partir de différents explants de Bananiers, se sont intéressés à l'obtention de cals. Certains les ont utilisés pour étudier la physiologie du fruit (MOHAM RAM et STEWARD, 1964) ou plus particulièrement des propriétés de leurs enzymes respiratoires (BRASIL, 1982). Ce n'est que très récemment que des chercheurs ont entrepris de produire des cals pour obtenir ensuite des plantes, cela à partir de tissus végétatifs (CRONAUER et KRIKORIAN, 1983) ou inflorescentiels (SRINIVASA et coll., 1982). Ces auteurs ont d'ailleurs noté, à partir de ces cals, le développement de racines, mais jamais de tiges.

L'objet du présent article est de présenter les résultats

* - F. BAKRY - IRFA/CIRAD - B.P. 5035 - 34032 MONTPELLIER Cédex

L. ROSSIGNOL : Laboratoire de Morphogenèse végétale expérimentale associé au CNRS, Bât. 360 - Université PARIS XI - 91405 ORSAY Cédex (France).

auxquels nous sommes parvenus, à partir de différents tissus de Bananiers, concernant la production de cals et, à partir de ceux-ci, les formes d'organogenèse que nous avons observées (aussi bien racinaires que caulinaires).

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal.

Il comprend divers types d'explants provenant soit de portions végétatives (plantes déjà cultivées *in vitro*), soit de parties reproductrices (tissus floraux ou inflorescentiels).

Le matériel reproducteur est le même en partie que celui utilisé dans un précédent article (BAKRY et coll., 1985). Il appartient essentiellement à des cultivars triploïdes (AAA) du groupe «Cavendish» et est prélevé dans la partie terminale (bourgeon mâle) d'inflorescences au stade mâle. Cette partie est composée de fleurs dites mâles (à étamines bien développées et gynécée réduit), situées à l'aisselle de bractées, et qui sont de plus en plus petites, voire inexistantes à mesure que l'on se rapproche du sommet de l'inflorescence. Après avoir stérilisé ce matériel selon les méthodes déjà indiquées (BAKRY et coll., 1985), ont été mis en culture des explants complexes [fragments d'apex inflorescentiels (cf. BAKRY et coll., 1985)], mais aussi des pièces florales (tépales, ovaires, styles + stigmates, anthères), entières ou fragmentées et des tissus inflorescentiels (bractées et sections d'axes).

Par ailleurs ont également été utilisés, après stérilisation, des ovaires bien développés de fleurs se trouvant dans la portion de l'inflorescence au stade femelle. Ceux-ci, après avoir été découpés en tranches de 5 mm d'épaisseur, sont déposés à plat sur les milieux de culture comme d'ailleurs en général l'ensemble des pièces florales ou inflorescentielles, à l'exception des apex.

Les explants végétatifs ont pour origine des plantes, déjà cultivées *in vitro* sur le milieu de base et à la lumière (cf. ci-dessous), d'un seul cultivar 'Americani' du groupe «Cavendish» (AAA). Il s'agit de fragments de feuilles (gaine, pétiole ou limbe), de 8 à 10 mm de côté, et de fragments de racines, de 1 cm de long, pour lesquels nous avons fait varier la position par rapport au milieu de culture.

Milieux de culture.

Le milieu de base utilisé (MSb) (cf. BAKRY et coll., 1985) comprend la solution minérale (macroéléments, microéléments et fer) de MURASHIGE et SKOOG (1962), les vitamines de MOREL (1951), 20 g/l de saccharose et 500 mg/l d'hydrolysate de caséine.

A ce milieu sont ajoutés, selon les besoins, des régulateurs de croissance : AIA (acide β indole acétique), ANA

(acide α naphthalène acétique), 2,4.D (acide 2,4.dichlorophénoxyacétique), 2,4,5.T (acide 2,4,5.trichlorophénoxyacétique), BAP (6 benzylaminopurine) et K (kinétine).

Enfin, dans certains cas, des substances fixatrices de phénols [charbon actif (0,5 ; 1 ; 3 g/l)] ou des réducteurs [acide citrique (150 mg/l), acide ascorbique (100 mg/l), cystéine (2 mg/l)] employés seuls ou conjointement, ont aussi été employés.

Le pH est ajusté à 5,6 (avec KOH) après avoir ajouté la gélose (7 g/l), s'il y a lieu.

Les milieux sont coulés en tubes avant l'autoclavage (20 mn, 115°C) ou bien après l'autoclavage en boîtes de Pétri.

Les cultures sont placées à 27°C et 70 p. 100 d'humidité relative, à l'obscurité totale ou à la lumière [16 h par jour, intensité 60 μ einst. cm⁻². sec.⁻¹ P.A.R. (tubes Philips TLS 40 W 33)].

Le repiquage, lorsqu'il a pu être réalisé, a été effectué tous les 45 jours.

Techniques histologiques.

Le matériel destiné à une étude histologique est fixé, durant au moins 24 h, dans l'alcool acétique [alcool éthylique à 100° (3 V), acide acétique pur (1 V)]. A la sortie du fixateur, les tissus sont déshydratés [alcool éthylique 70° (24 h), 90° (4 h), 95° (4 h), 100° (8 h) et alcool butylique (8 h à 3 jours)], inclus dans la paraffine et coupés au microtome à 7 μ m d'épaisseur. Les coupes sériées sont déposées sur des lames porte-objet, enduites d'eau gélatinée, et mises à sécher à l'étuve pendant au moins 72 h. Les lames sont ensuite déparaffinées (2 bains de xylène, 1 bain de xylène 1/2 + alcool 100° 1/2, 2 bains d'alcool 100°) et colorées au bleu alcian-safranine [3 à 5 mm dans le bleu alcian (1 g de bleu alcian dans 3 cc d'acide acétique et 97 cc d'eau distillée), rinçage à l'eau, puis 2 mn dans la safranine (1 g de safranine dans 100 cc d'alcool 70°)]. Elles sont enfin déshydratées et montées au baume du Canada.

RESULTATS

Observations relevant d'essais préliminaires.

Des essais préliminaires ont permis, en premier lieu, de faire une revue assez exhaustive du comportement de différents types d'explants prélevés dans les parties végétatives et reproductrices : la plupart d'entre eux peuvent donner naissance à des proliférations, d'aspects très divers selon les milieux et l'origine des tissus dont elles proviennent (BAKRY, 1984 b).

La recherche des principaux facteurs agissant sur la callogenèse nous a permis de constater que celle-ci nécessite, pour se manifester, la présence de régulateurs de croissance et qu'elle est favorisée surtout sur des milieux contenant des auxines telles que le 2,4.D ou du 2,4,5.T. De plus, les meilleures réponses sont obtenues lorsque les cultures sont placées à l'obscurité totale, au moins durant les deux premiers mois.

Ces résultats sont liés en grande partie à ce qu'il se produit, lors de l'ensemencement ou lors des repiquages, un noircissement intense des explants de Bananiers (à l'exception de ceux d'ovaires où il reste limité), accompagné ou non de celui du milieu, qui entraîne la nécrose et la mort des tissus en culture. Ce noircissement, très vraisemblablement dû à l'oxydation de composés phénoliques, est favorisé par la présence de cytokinines dans le milieu et aussi par l'exposition à la lumière. A l'inverse, il est ralenti à l'obscurité et surtout par suite de l'incorporation dans le milieu de substances telles que le 2,4.D ou le 2,4,5.T. L'addition de charbon actif ou de réducteurs n'a, par contre, que peu d'effet sur ces phénomènes et ne modifie en aucun cas l'issue des cultures.

A propos maintenant des divers explants utilisés, aucun cal repiquable n'a pu être établi à partir de fragments de racines ; ces derniers, le plus souvent, après l'implantation, noircissent et se nécrosent très rapidement.

Les résultats observés à partir de tissus floraux ou inflorescentiels et résumés dans le tableau 1 ne diffèrent guère d'ailleurs de ceux déjà cités avec ce matériel végétal par d'autres auteurs (MOHAM RAM et STEWARD, 1964 ; SRINIVASA et coll., 1982). Parmi les régulateurs de crois-

sance employés, seul le 2,4.D (à 1 mg/l) permet l'obtention de cals friables chez la presque totalité des explants étudiés (tableau 1). Suivant les explants, la localisation des tissus qui entrent en prolifération n'est pas la même. Nous avons ainsi pu noter que les cals portés par les anthères, sont initiés à partir des tissus superficiels, alors que ceux formés à partir de bractées proviennent de l'ensemble des tissus. De même, sur les tranches d'ovaires de fleurs «femelles», les cals se produisent uniquement à partir du méso et/ou de l'endocarpe tandis qu'ils intéressent également l'ectocarpe chez les sections d'ovaires de fleurs «mâles» (tableau 1). En présence d'ANA dans le milieu, associé ou non à de la BAP, seuls les tissus d'ovaires présentent des proliférations qui sont, cette fois-ci, compactes et originaires alors uniquement des tissus profonds (tableau 1). Malgré différents essais de traitements effectués sur ces cals, après repiquage des plus développés, nous n'avons pas réussi à provoquer l'apparition d'une organogenèse. Aussi les investigations à leur sujet n'ont pas été poussées plus loin.

Avec des explants foliaires, on obtient une localisation différente de la réponse dans les tissus de l'explant et ce suivant le ou la combinaison de régulateurs de croissance employés. Ainsi sur des milieux renfermant de l'AIA ou de l'ANA (de 1 à 10 mg/l), ces explants présentent, au niveau des assises superficielles situées au contact du milieu, un grandissement des cellules qui, pour aboutir au développement d'un cal, nécessite l'adjonction d'une cytokinine (BAP ou K de 0,1 à 10 mg/l). Les cals sont alors compacts, homogènes, constitués de grandes cellules, de couleur gris clair et n'atteignent jamais un grand développement. Au bout de deux mois de culture, ils prennent une teinte violette foncée puis meurent. Ils ne peuvent être repiqués sans que leur nécrose ne s'accélère. Cependant, si des

TABLEAU 1 - Callogenèse à partir des tissus floraux ou inflorescentiels. Intensité de la prolifération (au bout de 45 jours de culture à l'obscurité) en fonction de l'explant et du milieu utilisés.

Milieux de culture		MSb témoin sans régulateur de croissance	MSb + 2,4.D (en mg/l)			MSb + ANA (en mg/l)			MSb + ANA (1 mg/l) + BAP (en mg/l)		
			0,1	1,0	10,0	0,1	1,0	10,0	0,1	1,0	0,5
Sections d'ovaires de fleurs femelles	ectocarpe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	méso et/ou endocarpe	-	-	++	+	-	+	++	+	+	+
Sections d'ovaires de fleurs mâles	ectocarpe	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-
	méso et/ou endocarpe	-	-	++	+	-	+	++	+	+	+
Pistils + stigmates		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Anthères (âgées)		-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Tépales		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bractées (jeunes)		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Fragments d'axe inflorescentiel		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

- : aucune prolifération ; + : début de prolifération ; ++ : prolifération importante.

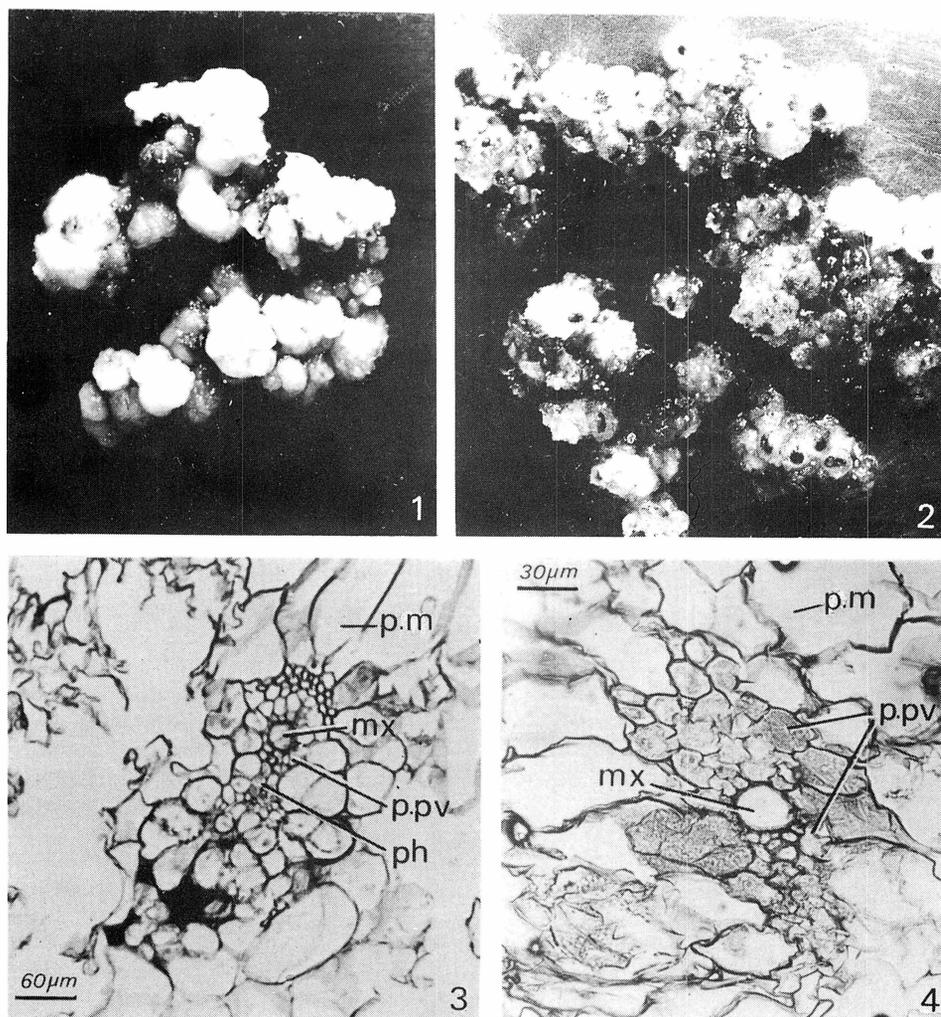


PLANCHE I - Callogenèse à partir de fragments foliaires.

1-2 : aspect des cals. 1 : cal obtenu avec le 2,4.D ; 2 : cal obtenu avec le 2,4,5.T.

3-4 : initiation des cals sur un milieu avec 2,4,5.T. 3 : densification des cellules du parenchyme périvasculaire (après 15 jours de culture) ; 4 : cloisonnement de ces cellules.

mx : gros vaisseau de métaxylème ; ph : phloème ; p.p.v : parenchyme périvasculaire ; p.m : parenchyme médullaire.

explants foliaires sont déposés sur des milieux contenant des substances telles que le 2,4.D ou le 2,4,5.T, la réaction des tissus est tout à fait différente. On assiste à la formation de cals d'origine interne, d'aspects très particuliers et qui sont parfaitement repiquables sur ces mêmes milieux sans qu'aucun phénomène de nécrose n'intervienne. Aussi, avons-nous choisi de nous intéresser de façon plus approfondie à ces cals qui, au cours des essais préliminaires, nous ont donné les résultats les plus prometteurs.

Callogenèse à partir de fragments de feuilles sur milieux contenant du 2,4.D ou du 2,4,5.T.

Notre travail a consisté d'abord à définir de façon précise les facteurs qui influent sur l'initiation de la callogenèse.

Initiation et croissance des cals.

Sur ces milieux, à l'inverse de ce que nous avons vu chez les bractées où tous les tissus entraînent en prolifération, les cals apparaissent, au bout de 45 jours en moyenne,

au niveau des nervures. Avec le 2,4.D, cette prolifération est précédée du grandissement des cellules des tissus superficiels. Toutefois, ces cellules qui ne se divisent pas, finissent par dégénérer.

Les cals sont compacts, pourvus de protubérances arrondies ou allongées, de couleur beige avec le 2,4.D (Planche I-1). Ils sont d'aspect plus lâche et de couleur plus blanche avec le 2,4,5.T (Planche I-2) ; ces derniers apparaissent comme étant constitués d'un enchevêtrement de petites structures élémentaires, en forme de disque (diamètre 1 à 3 mm), dont le bord est légèrement renflé et le centre souvent marqué par un massif de cellules plus denses qui fréquemment brunit dans les cultures âgées.

L'obtention de ces cals a été étudiée en fonction du territoire foliaire choisi et de certaines conditions de culture. C'est à l'obscurité une fois de plus, sur des explants placés horizontalement (surface de contact maximale) et sur des milieux contenant 0,5 à 1 mg/l de 2,4.D ou de 2,4,5.T que les aptitudes callogènes sont les mieux exprimées. La plus grande réactivité des tissus a été observée pour des prélèvements effectués au niveau du pétiole, surtout dans sa région de jonction avec le limbe et à la base de ce dernier, c'est-à-dire dans des zones qui correspondent par ailleurs à la partie de la feuille où la croissance intercalaire est maximale (SKUTCH, 1927, 1930). Par conséquent, par un choix judicieux du matériel, nous avons pu augmenter significativement la fréquence d'explants callogènes : celle-ci est devenue, en effet, proche de 100 p. 100, alors qu'elle variait de 15 à 20 p. 100 lors des expériences préliminaires.

Etude histologique.

Nous avons entrepris une étude histologique de l'initiation et du développement de ces cals, principalement pour ceux obtenus avec le 2,4,5.T, en raison de leur morphologie tout à fait particulière.

L'initiation de ces cals se situe au niveau des petites cellules du parenchyme périvasculaire (p. pv). En effet, après 15 jours de culture, certaines de ces cellules manifestent un gonflement limité et une densification de leur cytoplasme (Planche I-3). Au bout de 20 jours environ, on assiste à leur division. Au début, on observe seulement 4 à 5 cellules qui entrent en mitose mais, par la suite, c'est l'ensemble du parenchyme périvasculaire qui est touché (Planche I-4). Il y a alors formation, au niveau d'un seul faisceau libéro-ligneux, d'une ou de plusieurs proliférations indépendantes.

Après un mois, dans la partie externe de chacune de ces proliférations, on distingue des cellules au cytoplasme très dense qui se divisent radialement formant ainsi une zone rappelant par son fonctionnement celui d'un cambium. Aussi, l'avons-nous qualifiée de zone pseudo-cambiale (z.p.c.) (Planche II-1 et 2). Celle-ci repousse les nouvelles cellules surtout vers l'intérieur du cal et beaucoup moins

vers l'extérieur. Ultérieurement, une ébauche racinaire (eb. r) peut apparaître dans la partie interne du cal (Planche II-2), mais elle reste bloquée.

Les masses callogènes, complètement développées, prennent diverses formes [globulaire (gl.), en coupole, en disque (d) ou en structure plus ou moins invaginée (in)...], mais leur organisation interne est toujours respectée (à savoir zone pseudo - cambiale du côté externe, et, du côté opposé, une ébauche de racine) (Planche II-3).

Ainsi l'étude histologique confirme que les cals obtenus avec le 2,4,5.T sont bien constitués d'un enchevêtrement de structures callogènes élémentaires, plus ou moins en forme de disque (Planche II-3). Le massif de cellules plus denses brunissant par la suite, que nous avons souvent observé à l'oeil nu au centre de ces structures, correspond à une ébauche de racine bloquée, qui finit par se nécroser.

Des coupes réalisées dans des cals formés avec le 2,4.D montrent que leur initiation et leur développement ne diffèrent guère de ce que nous avons décrit avec le 2,4,5.T. Cependant, dans ce cas, la zone génératrice de cellules fonctionne indéfiniment, sans qu'il y ait différenciation de racines et les cals gardent une forme globulaire (pas d'aplatissement ni d'invagination). Ce mode de fonctionnement explique l'aspect macroscopique de ces cals, pourvus d'unités élémentaires plus ou moins arrondies.

Chez les cals formés sur 2,4,5.T, nous avons été tenté d'assimiler la structure en «disque» dont le centre est occupé par une ébauche de racine bloquée à celle d'un embryon (avec un cotylédon en forme de plateau évidé qui se prolonge par un corps cylindrique contenant l'extrémité radulaire). Cette hypothèse était d'autant plus plausible que des auteurs (CRONAUER et KRIKORIAN, 1983) avaient indiqué avoir obtenu des «embryoïdes» à partir de cormes de deux cultivars de Bananiers ['Pelipita' (ABB) et 'Saba' (AAB)], cultivés sur milieu liquide agité [solution minérale proche de celle de MSb + eau de coco 5 p. 100 v/v + 2,4,5.T (1 mg/l) + BAP (1 mg/l)]. Sachant cela, nous avons mis en culture sur le même milieu, des fragments de gaines foliaires, prélevés sur des plantes du cv 'Americani' (AAA) et cultivés *in vitro*. Après deux mois de culture, nous avons isolé des structures pourvues d'une masse cellulaire à la base (Planche II-4), qui sont identiques macroscopiquement à celles décrites par les auteurs précédemment cités. L'étude histologique des structures obtenues dans nos conditions d'expérience a montré que ce n'était pas des «embryoïdes» mais des ébauches de racines (Planche II-5), tout à fait similaires à celles observées sur milieux solides avec 2,4,5.T.

Entretien des cultures et essais d'induction de la caulogénèse.

Au bout de 4 mois et demi de culture en moyenne, les cals ont été isolés et repiqués. Ils conservent, au cours des

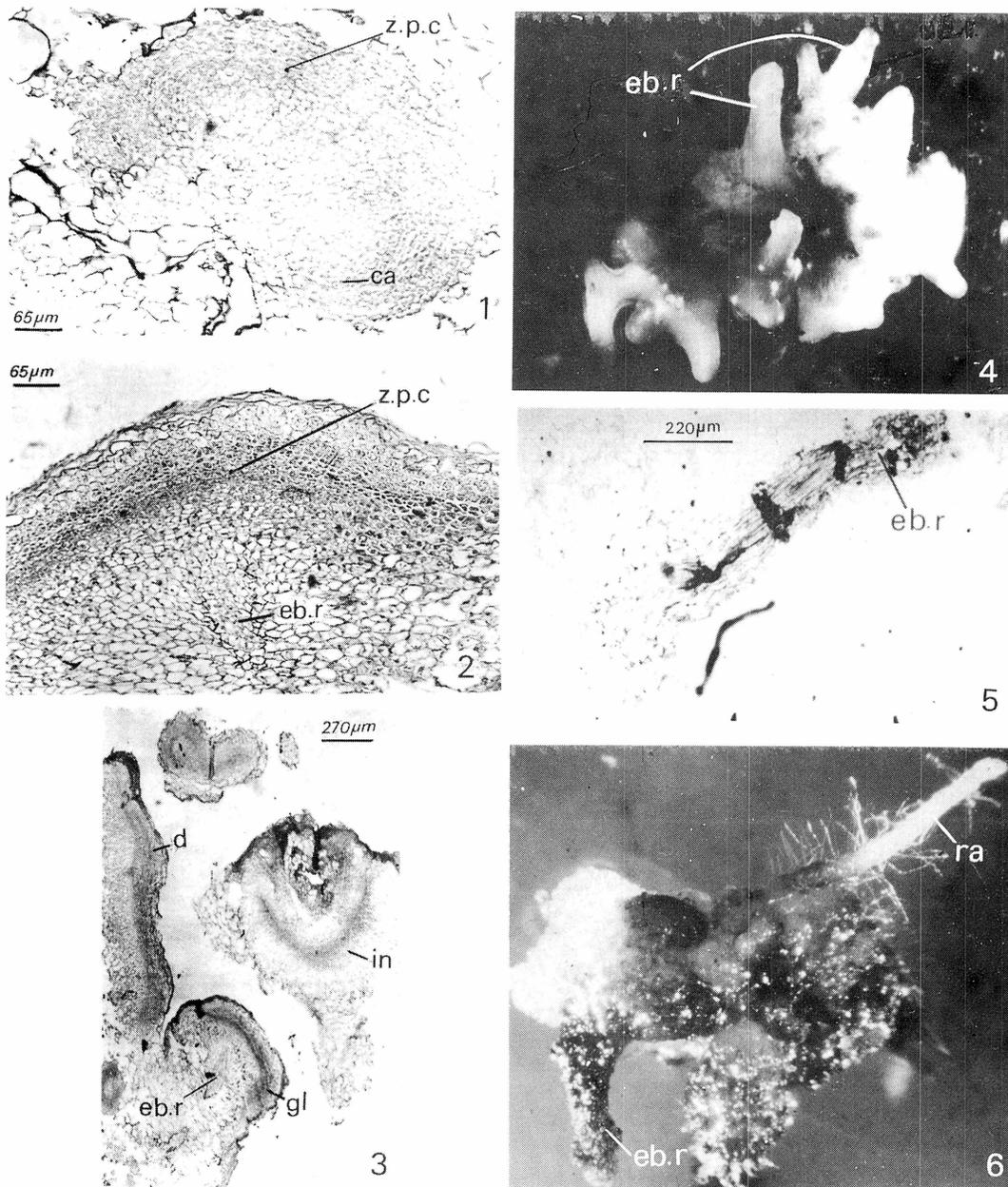


PLANCHE II - Callogenèse à partir de fragments foliaires sur milieu avec 2,4,5.T.

1 : cal déjà bien développé montrant, dans sa partie externe, une zone pseudo-cambiale ; 2 : zone pseudo-cambiale bien visible et apparition d'une ébauche de racine coupée tangentiellement ; 3 : diverses formes prises par les proliférations (gl : globulaire ; d : en disque ; in : en structure invaginée) ; 4 : développement d'ébauches racinaires en milieu liquide agité ; 5 : coupe longitudinale dans une de ces ébauches ; 6 : formation de racines (MSb + 2,4,5.T à 0,3 mg/l).

ca : cal ; z.p.c. : zone pseudo-cambiale ; eb. r : ébauche de racine ; ra : racine.

repiquages, leur morphologie respective si on ne change pas les milieux sur lesquels ils ont été obtenus (MSb + 2,4.D ou 2,4,5.T à 1 mg/l). Ils peuvent alors être entretenus, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, sans qu'aucun phé-

nomène de noircissement ni de nécrose ne survienne.

Les expériences visant à faire apparaître la caulogénèse [diminution de la concentration en régulateur de croissance

utilisé dans le milieu (2,4.D ou 2,4,5.T), simultanément ou non à l'adjonction d'une cytokinine (BAP ou K)] se sont traduites, le plus souvent, par le noircissement et la mort des tissus ; cela aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité et sur milieu solide ou liquide. On est seulement arrivé à maintenir des cals en survie sans ajouter de cytokinine et à condition que la concentration d'auxine soit égale ou supérieure à 0,5 mg/l pour le 2,4.D et 0,3 mg/l pour le 2,4,5.T. Par ailleurs, nous avons constaté que, lorsque les cals étaient placés sur un milieu contenant 0,3 mg/l de 2,4,5.T, les racines ne restent pas bloquées à l'état d'ébauches mais se développent (Planche II-6).

Par conséquent, tous les traitements effectués à partir de cals de feuilles pour promouvoir la caulogénèse ont échoué et ces cals n'ont pu donner naissance (pour l'instant et dans les conditions de culture utilisées) qu'à une organogénèse de type racinaire.

A l'inverse, nous allons voir que des cals apparus sur du matériel inflorescentiel ont présenté des caractéristiques plus intéressantes puisqu'ils ont été capables de manifester une organogénèse caulinaire.

Callogenèse à partir de fragments d'apex inflorescentiels.

Ainsi que nous l'avons déjà signalé dans un précédent article (BAKRY et coll., 1985), la culture *in vitro* de fragments d'apex inflorescentiels, notamment sur milieu MSb contenant une auxine et une cytokinine, a conduit à la production de pousses végétatives.

Initiation des cals.

Lorsque ces dernières sont isolées et repiquées sur le milieu de base (MSb), à la base de quelques-unes d'entre-elles, se sont développés des cals (Planche III-1).

Des proliférations d'aspect semblable se sont également développées, et de façon plus fréquente, directement sur des explants inflorescentiels, le plus souvent repiqués une ou plusieurs fois, et placés sur milieu de base (MSb) enrichi, à concentration égale, en auxine (AIA) et cytokinine (BAP ou K). Dans ce cas, elles sont formées en général en étroite continuité avec des tissus qui ont subi une forte activation (BAKRY et coll., 1985), soit dans la zone gonflée entourant la base de pousses feuillées, soit à proximité ou à partir de pièces florales hypertrophiées et profondément modifiées.

Tous ces cals, lors de leur initiation (celle-ci pouvant avoir lieu à la lumière comme à l'obscurité), sont composés d'un ensemble d'unités bien individualisées («nodosités»), petites (0,5 mm de diamètre), compactes, blanches et très opaques.

Croissance et entretien des cals.

Les cals, après avoir été isolés et repiqués, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, montrent une croissance active sur milieu MSb contenant en particulier AIA + BAP (à 2 mg/l) et une morphologie un peu différente. Ils prennent, en effet, au bout de 30 à 40 jours de culture, un aspect hétérogène, étant composés de «nodosités», de tailles très diverses. Au centre du cal, une zone dite de prolifération (z. pr) comprenant les «nodosités» les plus petites, d'aspect identique à celles ci-dessus décrites, mais de tailles plus variables (s'échelonnant entre 0,5 et 2 mm de diamètre). A la périphérie du cal, on trouve des «nodosités» beaucoup plus développées et à contour irrégulier qui constituent ce que nous avons appelé la zone de grandissement (z. gr) (Planche III-2).

L'observation microscopique d'un peu de matériel prélevé dans la zone de prolifération et monté entre lame et lamelle dans une goutte de carmin acétique, indique que chacune des petites unités de cette zone correspond en réalité à un amas cellulaire bien individualisé provenant du cloisonnement d'une seule cellule initiale (Planche III-3). Ensuite, chacune de ces unités, placées à proximité ou au contact les unes des autres, évolue en une structure plus importante, comportant des cellules homogènes et limitées par un épiderme (ep) (Planche III-4). Une coupe histologique pratiquée dans une de ces «nodosités» plus développées de la zone de grandissement (Planche III-5) permet d'observer un début de différenciation cellulaire dans les tissus internes et une bordure externe, délimitée par une assise épidermique, qui présente de nombreuses circonvolutions. Ces dernières apparaissent comme étant dues à la formation de nouvelles petites unités à partir d'une «nodosité» déjà ancienne. Autrement dit, chaque «nodosité», lorsque sa croissance est terminée, est capable, semble-t-il, de redonner de jeunes structures de même nature qu'elle. Il s'en suit que les cals ont un aspect hétérogène puisque constitués d'unités, toutes issues les unes des autres, mais à divers états de développement. On peut aussi penser que certaines «nodosités» développées sont le résultat de la fusion de plusieurs petites «nodosités».

L'aspect de ces cals n'est pas sans rappeler la morphologie précédemment décrite de ceux produits sur fragments de feuilles avec 2,4.D, mais, à l'inverse de ces derniers, ils peuvent être entretenus sans présenter aucun phénomène de noircissement ni de nécrose en l'absence de 2,4.D et en présence de fortes concentrations de cytokinine dans le milieu (jusqu'à 10 mg/l de BAP par exemple).

Obtention de néoformations caulinaires.

Seuls les cals repiqués sur le milieu MSb + AIA + BAP (à 2 mg/l) ont manifesté une organogénèse caulinaire qui s'exprime selon des modalités différentes, dépendant avant tout du stade de développement des «nodosités» (en début de croissance ou complètement développées).

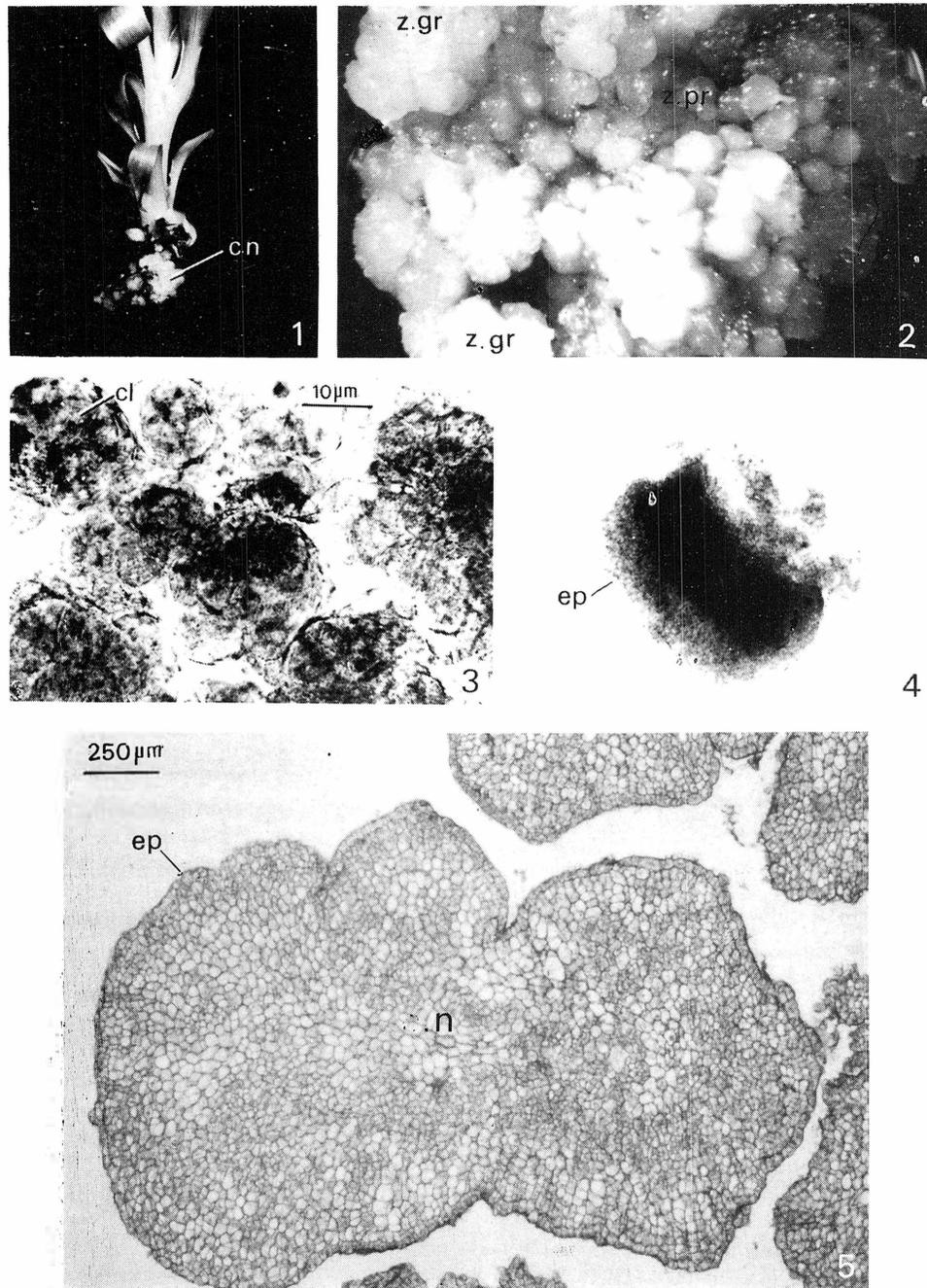


PLANCHE III - Analyse de cals à «nodosités» originaires de tissus provenant d'apex inflorescentiels.

1 : formation d'un cal à la base d'une pousse feuillée provenant de la réversion d'un bouton floral (milieu MSb) ; 2 : morphologie d'un de ces cals : présence de deux zones contiguës, d'apparence distincte - la zone de prolifération et - la zone de grandissement (milieu MSb + AIA (2 mg/l) + BAP (2 mg/l) ; 3 : observation de matériel prélevé dans la zone de prolifération ; individualisation de cellules et cloisonnement ; 4 : «nodosité» isolée dans la zone de grandissement ; 5 : coupe histologique réalisée dans une de ces «nodosités».

c.n : cal à «nodosités» ; z. pr : zone de prolifération ; z. gr : zone de grandissement ; cl : cloison ; ep : épiderme ; n : «nodosité».

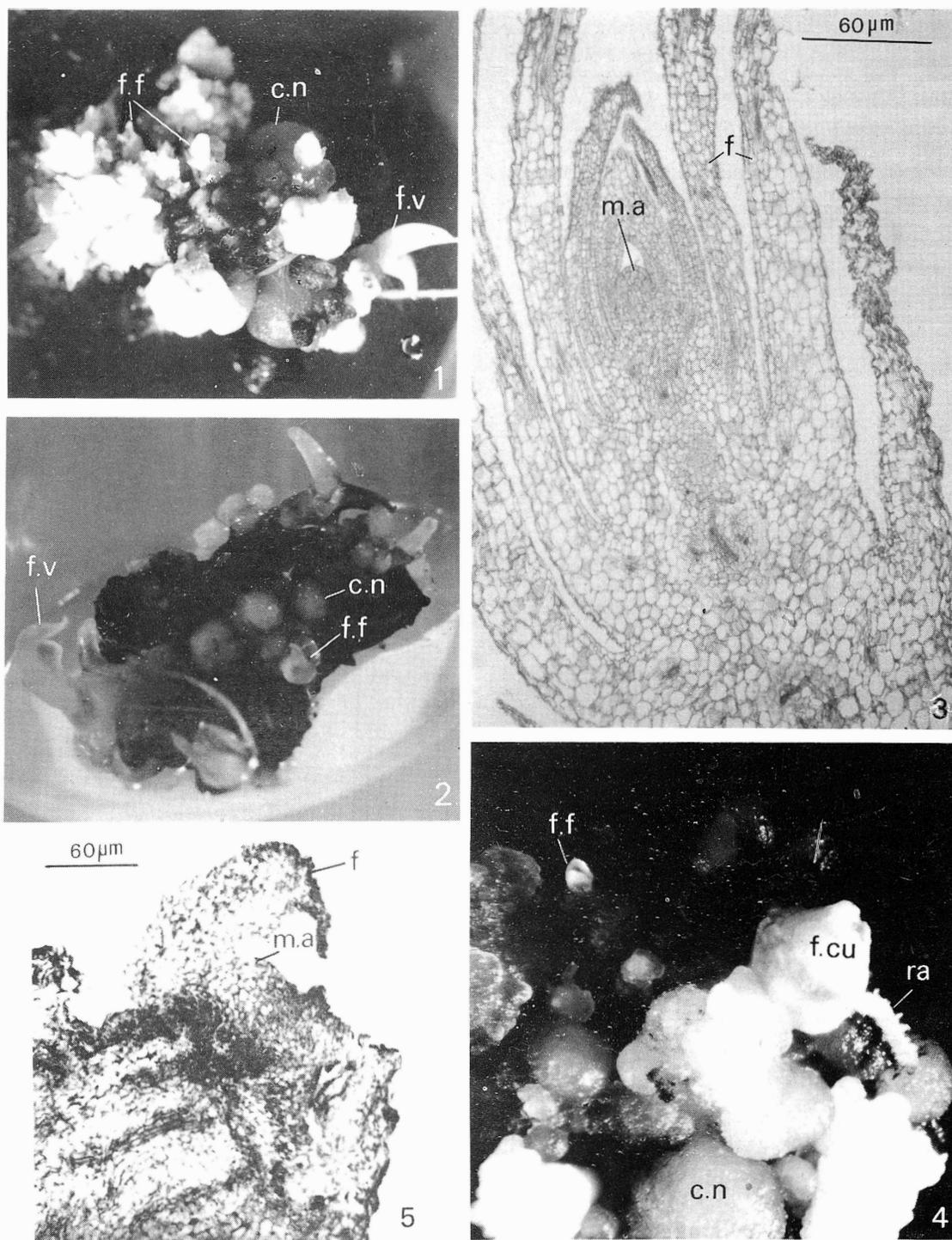


PLANCHE IV - Organogenèse caulinaire sur les cals à «nodosités» d'origine inflorescentielle.
 1 et 2 : développement de formations foliacées à la surface des «nodosités» apparues depuis peu de temps ;
 3 : coupe histologique dans une «nodosité» portant des formations foliacées ; 4 : néoformation caulinaire à la surface d'un cal ; 5 : coupe histologique passant par l'une de ces néoformations.
 c.n : cal à «nodosites» ; n : «nodosité» ; f.f : formations foliacées ; f.v : feuilles vertes ; m.a : méristème apical ; f : feuille en ébauche ; f.cu : feuille en cupule ; ra : racine.

Ainsi, sur des cals initiés depuis relativement peu de temps (4 à 5 mois), à la surface des petites «nodosités» (de 1 à 2 mm de diamètre), peuvent apparaître des formations foliacées (f.f) dont l'épiderme est en parfaite continuité avec celui de la «nodosité». Ces formations, insérées très régulièrement en couronne, sont en forme d'écaille (de 1 à 2 mm de hauteur), translucides, de couleur beige ou vert clair (Planche IV-1 et 2). Parfois des feuilles vertes (f.v) se sont développées. Des coupes histologiques révèlent, dans certains cas, l'existence d'un méristème apical caulinaire (m.a.) au centre de la couronne foliaire (Planche IV-3). L'isolement et le repiquage des formations foliacées avec la «nodosité» qui les porte sur milieu MSb peut conduire à la formation de jeunes pousses feuillées qui s'enracinent ensuite.

Avec des cals plus âgés, entretenus depuis plus d'un an, sur les «nodosités» alors de plus grande taille (5 mm de diamètre environ), on a pu noter encore la présence plus rare de formations foliacées. Celles-ci sont, à présent, de formes plus variables et disposées de façon complètement désordonnée. De plus, elles restent bloquées à l'état d'ébauches et finissent par se nécroser, même après isolement et repiquage de la «nodosité» qui les a produites sur milieu MSb. Dans ce cas, il n'y a pas jamais de méristème caulinaire.

Toutefois, sur ces cals plus âgés, nous avons pu constater tout de même le développement de pousses feuillées, initiées à partir de la prolifération limitée et uniforme des tissus épidermiques de «nodosités» (Planche IV-4). Les premières feuilles qui apparaissent sont en forme de cupule (f. cu), très opaques, épaisses et de couleur verte. Les suivantes se forment au centre des premières, selon une morphologie classique de jeune plante de Bananier *in vitro* et souvent seulement après repiquage de ces pousses sur milieu MSb. L'étude histologique montre qu'un méristème apical (m.a) est toujours présent au sommet de ces structures et qu'elles sont en continuité avec le reste du cal (Planche IV-5).

Toutes les plantes ainsi obtenues (en tout une vingtaine), par l'une ou l'autre voie d'organogenèse, n'ont présenté aucune modification macroscopiquement décelable *in vitro*.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

L'étude histologique de l'initiation et du développement des cals sur fragments de feuilles de Bananiers indique que seules les cellules proches des faisceaux libéro-ligneux entrent en division. Cette observation avait déjà été effectuée à propos de cals de feuilles, formés sur des milieux proches des nôtres (en particulier avec 2,4.D) et appartenant à d'autres espèces végétales telles que le Palmier à huile (AHEE et coll., 1981) ou le Sorgho (WERNICKE, 1982). Il semble donc que, tout au moins chez un certain nombre de Monocotylédones, toutes les cellules de la feuille ne puissent pas se différencier et devenir méristématiques

et que cette possibilité soit alors réservée à celles qui sont proches des faisceaux (WERNICKE, 1982). Il n'en est pas toujours ainsi puisque, en utilisant cette même auxine, BONNEL et coll. (1983) ont noté que, chez la Canne à sucre, l'ensemble des tissus foliaires participait à la formation du cal. On peut signaler aussi, à ce niveau, que nous avons réussi, en employant d'autres régulateurs de croissance, à obtenir des proliférations à partir de tissus superficiels de feuilles de Bananiers.

Chez ces plantes, en tout cas, l'analyse de la callogenèse à partir de fragments de feuilles, sur milieu avec 2,4,5.T en particulier, a permis de montrer que la séquence des étapes qui mène d'un petit massif de cellules méristématiques vers un cal complètement développé est toujours identique. Elle est l'expression d'un programme de développement (et surtout pas d'une prolifération anarchique) qui aboutit à des structures particulières («en disque» munies souvent d'une ébauche de racine), pouvant être considérées comme de véritables «culs de sac» morphogénétiques. En effet, ces cals n'évoluent plus au cours des repiquages qu'en reproduisant indéfiniment les mêmes structures. La même conclusion peut s'appliquer aux cals obtenus avec 2,4.D si ce n'est que leur développement n'est jamais poussé aussi loin. Ce type de situation n'est pas sans rappeler ce qui a été déjà mentionné par certains auteurs (KING et coll., 1978 ; CURE et MOTT, 1978) pour les cals de céréales qui ne seraient rien d'autre que des cultures aberrantes de racines plus ou moins différenciées.

Si l'organisation caractéristique «en disque» des cals formés sur 2,4,5.T pouvait, nous l'avons dit, faire penser à une embryogenèse somatique, grâce à une étude histologique précise, nous avons pu rejeter cette hypothèse. En effet, sur aucune des structures observées avec 2,4.D comme avec 2,4,5.T, il n'existe de méristème caulinaire en relation avec l'ébauche de racine ni, surtout, d'épiderme général les entourant, la présence de ce tissu étant une condition nécessaire mais pas suffisante pour définir un embryon (qu'il soit zygotique ou somatique).

A l'inverse, les observations faites sur des cals initiés à partir d'explants inflorescentiels complexes et entretenus depuis peu de temps nous ont conduit à penser que, dans ce cas, on pourrait bien se situer dans le cadre d'une embryogenèse somatique. Ces cals sont, en effet, formés d'un ensemble de petites unités (ou «nodosités») qui, très tôt, au cours de leur formation, différencient un épiderme les individualisant. On peut admettre alors que les petites «nodosités» représentent les premiers stades du développement d'embryons somatiques. Lorsque les conditions sont favorables, ces «nodosités» pourraient poursuivre leur développement jusqu'à l'état de jeunes plantes et, si les conditions ne sont pas adéquates, cette évolution n'aurait pas lieu et elles continueraient à croître sous leur forme primitive (épiderme + tissus internes).

L'apparition de jeunes plantes, sur des cals, en culture depuis plus d'un an, et originaires de tissus épidermiques

des «nodosités» semble, elle, être due à un autre mécanisme : un processus de néoformation de bourgeons sur cal. En effet, nous avons pu constater, d'une part, que les premières feuilles émises par ces plantes ont une forme et un aspect tout à fait particuliers, bien différents de celles portées par les jeunes individus issus, à notre avis, d'embryogenèse somatique. D'autre part, des coupes histologiques ont clairement montré que le méristème caulinaire de ces plantes est en parfaite continuité vasculaire avec les tissus internes du cal et non en discontinuité comme le laisserait supposer un développement embryogénétique. C'est la première fois, à notre connaissance, que des plantes ont été obtenues à partir de culture de tissus de Bananiers.

Outre le fait qu'ils présentent une organogenèse caulinaire, les cals obtenus à partir d'apex inflorescentiels constituent, pour les Bananiers, un matériel très intéressant. En effet, ils permettent de s'affranchir des phénomènes de noircissement et de nécrose et ainsi de pouvoir utiliser dans les milieux de fortes concentrations de cytokinine, l'emploi de ces substances étant pratiquement impossible avec les autres types de proliférations. C'est d'ailleurs aussi seulement à partir de ces cals qu'a pu être réalisé l'isolement de protoplastes (BAKRY, 1984 a). En conséquence, ils ouvrent des voies de travail, jusqu'alors inter-

dites.

En conclusion, on peut dire qu'on connaît maintenant, du moins en partie, quels sont le lieu, les conditions d'initiation et la morphologie des cals (cals à «nodosités») qui ont manifesté une organogenèse caulinaire.

Actuellement, les travaux sont orientés vers l'obtention systématique de cals «à nodosités» à partir de tissus inflorescentiels mais aussi végétatifs et également vers l'augmentation du taux d'organogenèse caulinaire sur ces cals en cherchant à maîtriser l'une ou l'autre des deux voies d'ontogenèse. Ce programme devra bien sûr être poursuivi sur le matériel déjà étudié (cultivars : AAA) mais aussi étendu à des Bananiers qu'on se propose d'améliorer et qui appartiennent aux groupes AAB et ABB.

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien de l'IRFA/CIRAD, B.P. 5035 - 34032 Montpellier Cédex. Nous adressons, en outre, nos plus vifs remerciements à Mme CORAIL pour son assistance technique, ainsi qu'à M. HAICOUR pour ses judicieux conseils.

BIBLIOGRAPHIE

- AHEE (J.), ARTHUIS (P.), CAS (G.), DUVAL (Y.), GUENIN (G.), HANOVER (J.), HANOVER (P.), LIEVOUX (D.), LIORET (C.), MALAURIE (B.), PANNETIER (C.), RAILLOT (D.), VACHERON (D.) et ZUCKERMAN (L.). 1981.
La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique.
Oléagineux, 36, 113-118.
- BAKRY (F.): 1984a.
Choix du matériel à utiliser pour l'isolement de protoplastes de bananier (*Musa* sp. p.), Musacées.
Fruits, 39 (7-8), 449-452.
- BAKRY (F.) 1984 b.
Application des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration des Bananiers (*Musa* sp.).
Thèse de 3ème cycle, Université de Paris XI, Centre d'Orsay, 126 p.
- BAKRY (F.), LAVARDE (F.), ROSSIGNOL (L.) et DEMARLY (Y.). 1985.
Développement de pousses végétatives à partir de la culture *in vitro* d'explants inflorescentiels de Bananiers (*Musa* sp.) Musacées.
Fruits, 40 (7-8), 459-465.
- BONNEL (E.), DEMARLY (Y.) et ESSAD (S.). 1983.
Evolution anatomique des tissus foliaires de canne à sucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*.
Can. J. Bot., 61, 830-836.
- BRASIL (O.G.). 1982.
Tissue culture from Banana fruit (*Musa acuminata* AAA). Growth and some respiratory enzyme property from banana fruit callus.
in : *Proc. 5th. Inter. Congr. Plant Tissue and Cell culture, Tokyo*, p. 79.
- CRONAUER (S.) and KRİKORIAN (A.D.). 1983.
Somatic embryos from cultured tissues of triploid Plantains (*Musa* «ABB»).
- Plant Cell Reports*, 2, 289-291.
- CURE (W.W.) and MOTT (R.L.). 1978.
A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissues of maize, wheat and oat.
Physiol. Plant., 42, 91-96.
- FLICK (C.E.), EVANS (D.A.) and SHARP (W.R.). 1984.
Organogenesis chap. 2, p. 13-81.
in *Handbook of plant cell culture. vol. 1. Techniques for propagation and breeding. EVANS (D.A.), SHARP (W.R.), AMIRATO (P.V.) and YAMADA (Y.) eds., Macmillan Publishing Co., New-York.*
- KING (P.J.), POTRYKUS(I.) and THOMAS (E.). 1978.
In vitro genetics of cereals : problems and perspectives.
Physiologie végétale, 16, 381-399.
- KRİKORIAN (A.D.) and CRONAUER (S.). 1984.
Aseptic culture techniques for Banana and Plantains Improvement.
Economic Botany, 38 (3), 322-331.
- MOHAN RAM (H.Y.) and STEWARD (F.C.). 1964.
The induction of growth in explant tissue of the banana fruit.
Can. J. Bot., 42, 1569-1579.
- MOREL (G.) and WETMORE (R.H.). 1951.
Fern callus tissue culture.
Amer. J. Bot., 38, 141-143.
- MURASHIGE (T.) and SKOOG (F.). 1962.
A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497.
- SKUTCH (A.F.). 1927.
Anatomy of the leaf of banana, *Musa sapientum* L. var. hort. Gros Michel.
Bot. Gaz., 84, 337-391.
- SKUTCH (A.F.). 1930.
On the development and morphology of the leaf of the banana

(*Musa sapientum* L.).
Am. Journ. Bot., 17, 252-271.

SRINIVASA RAO (N.K.), CHACKO (E.K.), DORE SWAMY (R.)
 and NARAYANASWAMY (S.). 1982.
 Induction of growth in explanted inflorescence axis of banana.
Current Science, 51 (13), 666-667.

WERNICKE (W.) and BRETELL (R.). 1982.
 Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*.
Protoplasma, 111 (1), 19-27.

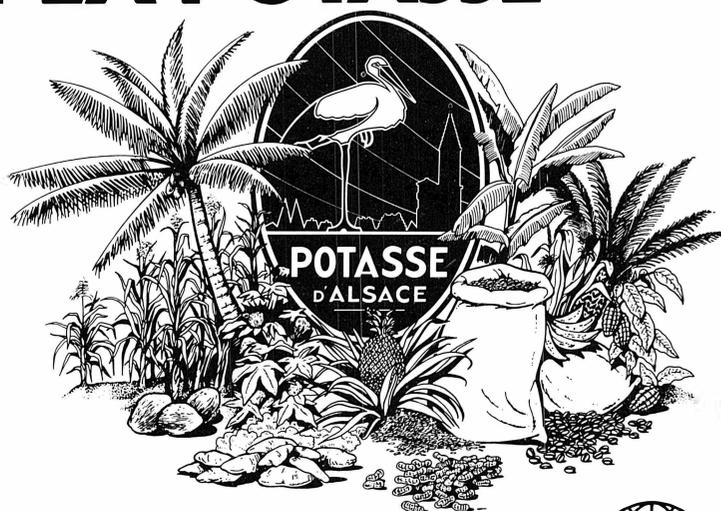
WERNICKE (W.), BRETELL (R.), WARIZUKA (T.) and POTRYKUS
 (I.). 1981.
 Adventitious embryoid and root formation from rice leaves.
Z. Pflanzenphysiol. Bd., 103, 361-365.



LES CULTURES TROPICALES AIMENT LA POTASSE

QUALITE
 RENDEMENT
 PROFIT

engrais
 potassiques



GRUPE EMC

SOCIÉTÉ COMMERCIALE DES POTASSES ET DE L'AZOTE

62-68, rue Jeanne d'Arc - 75646 PARIS CEDEX 13

Tél. : 584.12.80 Téléx : P.E.M.C. 20191 F

