

NOTE TECHNIQUE

Mise au point d'une technique de caractérisation de quelques génotypes de bananiers (*Musa* sp.) cultivés *in vitro* par électrophorèse des estérases.

J.P. HORRY*

INTRODUCTION

L'amélioration génétique des bananiers à fruits comestibles (*Musa* sp. p.) est, à l'heure actuelle, une des stratégies prioritaires qui doit permettre de lutter contre la recrudescence de certaines maladies (fusarioses, cercosporioses) (GANRY, 1984). En raison de l'échec relatif des méthodes d'hybridation classiques des génotypes cultivés avec des espèces sauvages (GANRY, 1983), un programme d'amélioration par culture *in vitro* a été mis en oeuvre (BAKRY, 1984), dont on peut définir les objectifs principaux :

1) Extension de la variabilité que l'on peut obtenir par réversion vers l'état végétatif, par obtention de néoformations sur cals ou par culture de protoplastes.

2) Sélection précoce de clones présentant les caractéristiques souhaitées.

3) Culture de fragments d'apex dont la technique, maintenant bien établie, permettra la multiplication végétative rapide et la dissémination des clones sélectionnés.

Le but de ce travail était de définir un critère de détection précoce, suffisamment précis et fiable, de la variabilité que l'on peut obtenir *in vitro*, dans le double objectif de mettre en évidence des clones néoformés intéressants ou de disposer d'un moyen pour juger de la conformité de la multiplication accélérée.

Nous avons pensé que l'analyse en électrophorèse du polymorphisme enzymatique était une voie intéressante pour atteindre ce double objectif.

La présente note décrit une technique permettant d'obtenir rapidement et simplement un extrait brut des protéines de plantes cultivées *in vitro*, âgées de quelques semaines, susceptible d'être analysé en électrophorèse. Cependant, avant d'appliquer cette technique pour caractériser, si possible, les clones provenant de cultures *in vitro*, nous avons choisi d'étudier le système estérasique chez quelques génotypes de la section *Musa*. Ceci afin de mettre au point d'abord une technique d'électrophorèse permettant l'identification des divers génotypes de bananiers, comme cela a déjà été réalisé chez d'autres végétaux (AUTRAN et BOURDET, 1975 ; AURIAU et al., 1976 ; RICKEMAN et DESBOROUGH, 1978 ; GRISON et al., 1979 ; BERTHOU et al., 1980 ; BLANCHARD, 1981 ; BITONDI et MESTRINER, 1983 ; SCHMIDT-STOHN et WEHLING, 1983 ; ABBOTT et al., 1984 ; KAWASE et SAKAMOTO, 1984 ; FELDMANN, 1984).

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal.

Le matériel végétal utilisé est composé de jeunes plantes multipliées *in vitro* par fragmentation d'apex végétatifs et appartenant à 4 génotypes :

- 1 espèce sauvage diploïde : *M. acuminata* ssp. *malaccensis* (AA).
- 4 cultivars triploïdes : 'Americani' (AAA), 'French plantain' (AAB), 'Plantain cv. Ekona' (AAB), 'Bluggoe' (ABB).

Les plantes sont cultivées sur 20 ml de milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962), solidifié par 7 g/l d'Agar, en tubes de 30 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre, dans des chambres de culture, sous conditions contrôlées (photopériode : 12 h avec une intensité lumineuse de

* - Laboratoires de Morphogénèse végétale expérimentale et d'Amélioration des Plantes, associés au CNRS (UA 115).
Bat. 360 - Université Paris Sud - 91405 ORSAY (France)

62 μ einst.-cm⁻². sec⁻¹ ; température : 27°C \pm 1°C ; humidité relative : 70 p. 100). Lorsque la plante atteint le haut du tube, la pseudo-tige est coupée à 2,5 cm environ au-dessus de la racine la plus haute. La portion située sous la racine est repiquée sur milieu neuf. Les limbes foliaires sont séparés des pétioles, rapidement pesés et mis en chambre froide.

Il est à noter que la plante, une fois les feuilles prélevées, est remise en culture. Le méristème caulinaire est préservé, et, après quelques semaines, la plante a régénéré son système foliaire.

Extraction des protéines solubles.

Toutes les opérations se font en chambre froide, à 0-4°C. Elles sont résumées dans le tableau 1. Tous les limbes d'une même plante sont coupés en lanières et doucement broyés dans un mortier en présence de la solution d'extraction. Après deux centrifugations, le surnageant est fractionné en aliquots de 200 μ l et conservé à -18°C.

TABLEAU 1 - Extraction des protéines solubles.

1 - Broyage

pour 1 g de feuille :

- 0,25 g de polyvinylpyrrolidone (PVP) insoluble (SERVA, Polyclar AT, ref. 33162).

- 2 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 ; ascorbate de sodium 2 g/l.

2 - Centrifugation du broyat.

25 min, 30 000 g, 4°C.

Le surnageant est récupéré.

3 - Centrifugation du surnageant.

15 min, 5 000 g, 4°C.

Le surnageant obtenu est conservé à -18°C jusqu'à son utilisation.

Electrophorèse.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8 p. 100 (acrylamide : bisacrylamide = 20 : 1), en tampon TRIS-borate-EDTA pH 8,1 est essentiellement réalisée selon la technique de BLANCHARD (1981), sur un appareil vertical (BIORAD, modèle 220) thermostaté à 0-5°C. 40 μ l d'échantillon et 5 μ l de bleu de bromophénol sont déposés dans chaque puits. L'électrophorèse est conduite à 160 V (environ 14 V/cm) jusqu'à ce que la bande de bleu de bromophénol ait migré à quelques millimètres du bas du gel. Le gel est ensuite préincubé 15 min en tampon phosphate de sodium 0,5 M, pH 6,0 et incubé pendant 1 h dans la solution de révélation : phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,0 ; α -naphthyl acétate 500 mg/l (SIGMA, Ref. N 8505) ; Fast Blue RR salt 1 g/l (SIGMA, Ref. F 0500). Le gel est finalement fixé dans une solution d'acide acétique à 7 p. 100 et observé sur un transluminateur. La

position des bandes est mesurée et le coefficient Rf calculé comme le rapport de la distance de migration de la bande à celle du bleu de bromophénol.

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre but était de mettre au point une technique simple et fiable destinée à caractériser quelques génotypes de bananiers par électrophorèse des estérases. Lors de nos essais, différentes méthodes d'extraction furent utilisées (modification du pH, des concentrations relatives des composants, divers antioxydants, etc.). Celle que nous avons finalement adoptée, permet une préparation rapide de l'extrait, ce qui tend à éviter une perte d'activité des enzymes, et les profils estérasiques ainsi obtenus sont reproductibles (le minimum est de 4 essais pour le cultivar 'Bluggoe').

Nos expériences nous ont conduit à établir, pour chacune des variétés, les zymogrammes représentés figure 1. Certaines bandes sont difficiles à discerner sur le gel, mais avec suffisamment d'attention, nous avons toujours pu les distinguer, une réserve étant faite quant aux bandes de Rf supérieur à 0,5 : Celles-ci sont en effet très sensibles au cours des manipulations. Sur un même extrait, nous avons tantôt pu les mettre clairement en évidence, tantôt elles se présentaient comme des taches floues, L'ab-

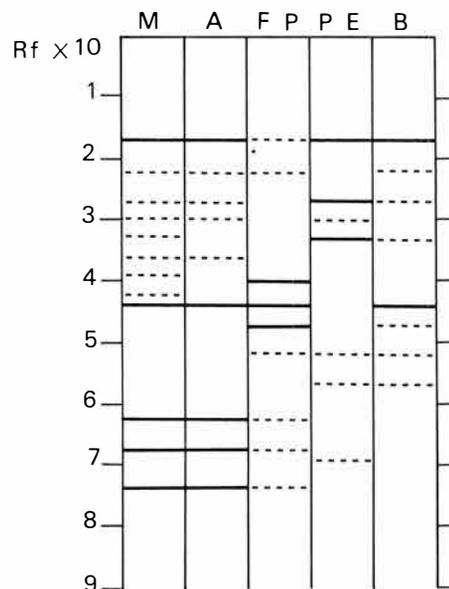


Figure 1 - Zymogrammes estérasiques de 5 variétés de bananiers. M : *M. acuminata* ssp. *malaccensis* (AA) ; A : 'Americani' (AAA) ; FP : 'French plantain' (AAB) ; PE : 'Plantain cv. Ekona' (AAB) ; B : 'Bluggoe' (ABB) ; la révélation fait apparaître des bandes bien caractérisées (—) et des bandes de plus faible intensité (- - -).

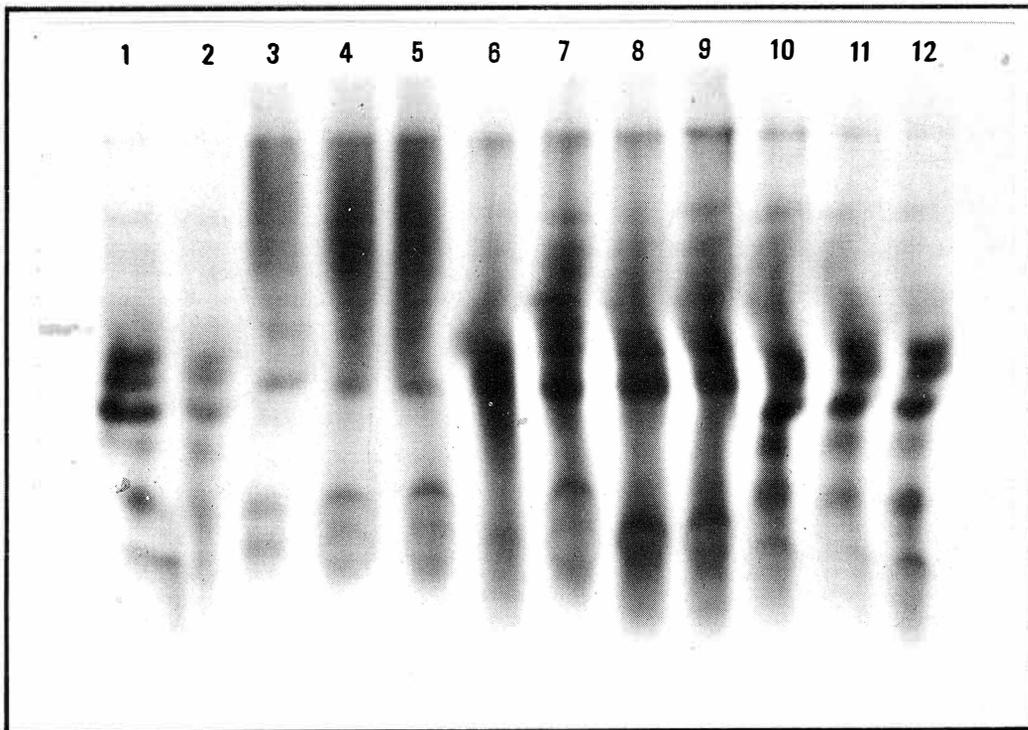


Figure 2 - Zymogrammes estérasiques de trois variétés de bananiers. De la gauche vers la droite : Puits 1, 2, 10, 11, 12 : 'French plantain' (AAB) ; puits 3, 4, 5 : 'Americani' (AAA) ; puits 6, 7, 8, 9 : *M. acuminata* ssp. *malaccensis* (AA).

sence de ces bandes est donc à considérer avec précaution, celle-ci pouvant n'être due qu'à une dénaturation et non le fait de la variabilité.

Le faible nombre d'échantillons différents de chaque génotype dont nous disposons ne nous permet pas de conclure quant à la variabilité intraspécifique. Cependant, le fait que l'on observe des profils différents pour les deux représentants du groupe Plantain laisse à supposer que cette variabilité existe.

Bien que les différences entre bananiers diploïdes (AA) et triploïdes (AAA) du génome *acuminata* soient faibles (figure 2), la variation entre les autres génotypes est suffisamment importante pour concevoir que le système estérasique est loin d'être monomorphe chez les bananiers.

Il convient d'examiner maintenant si ce système peut

être utilisé pour détecter, à la fois rapidement et précocement, la variabilité que l'on peut obtenir par l'utilisation de la culture *in vitro*.

Il serait également intéressant d'envisager l'étude du polymorphisme d'autres systèmes enzymatiques, de la composition en protéines ou de la structure de l'ADN mitochondrial.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur DEMARLY, Mesdames L. ROSSIGNOL et Y. DATTEE pour nous avoir accueillis dans leur laboratoire et permis de réaliser ce travail et Monsieur F. BAKRY pour l'aide qu'il nous a apportée.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBOTT (A.G.), AINSWORTH (C.C.) et FLAVELL (R.B.). 1984. Characterization of anther differentiation in cytoplasmic male sterile maize using a specific isozyme system (esterase). *Theor. Appl. Genet.*, 67, 469-473.
- AURIAU (P.), AUTRAN (J.C.), CHARBONNIER (L.), DOUSSINAULT (G.), FEILLET (P.), GODON (B.), GRIGNAC (P.), JOUDRIER (P.), KOBREHEL (K.), KOLLER (J.), ROUSSET (M.) et RIVALLANT

- (S.). 1976. Variabilité génétique de la composition des gliadines, glutenines, β -amylases, α -estérases, peroxydases et phosphatases acides du blé (*T. aestivum*). *Ann. Amélior. Plantes*, 26 (1), 51-66.
- AUTRAN (J.C.) et BOURDET (A.). 1975. L'identification des variétés de blé : Etablissement d'un tableau

- général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain.
Ann. Amélior. Plantes, 25 (3), 277-301.
- BAKRY (F.). 1984.
Application des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration du bananier (*Musa* sp.).
Thèse de troisième cycle, Orsay, 126 p.
- BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.), HAMON (S.), VEDEL (F.) et QUETIER (F.). 1980.
Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers : Variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages. Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces : *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*.
ASIC, 9e Colloque, Londres.
- BITONDI (M.M.G.) et MESTRINER (M.A.). 1983.
Esterase isozymes of *Apis mellifera* : Substrats and inhibition characteristics, developmental ontogeny and electrophoretic variability.
Bioch. Genet., 21, 985-991.
- BLANCHARD (M.). 1981.
Polymorphisme enzymatique du pois cultivé.
Thèse de troisième cycle, Orsay.
- FELDMANN (Ph.). 1984.
Analyse du polymorphisme enzymatique de la canne à sucre (*Saccharum* sp.) : Utilisation pour la recherche de variabilité après culture *in vitro*.
Thèse troisième cycle, Orsay, 145 p.
- GANRY (J.). 1983.
Les recherches génétiques sur bananiers. Vers une organisation internationale.
Doc. interne IRFA, Dec. 1983.
- GANRY (J.). 1984.
Perspective de la recherche au service de la production bananière.
Fruits, 39 (5), 298-301.
- GRISON (C.), CUNY (B.), BESSON (A.) et NIVERT (C.). 1979.
Définition du contrôle de la qualité. Mise au point d'une méthode de détermination des variétés par électrophorèse.
Action concertée : INRA-ITPT.
- KAWASE (M.) et SAKAMOTO (S.). 1984.
Variation, geographical distribution and genetical analysis of esterase isozymes in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. BEAUV.
Theor. Appl. Genet., 67, 529-533.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.
A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497.
- RICKEYMAN (V.S.) et DESBOROUGH (S.L.). 1978.
Elucidation of the evolution and taxonomy of cultivated potatoes with electrophoresis. I- Groups *Tuberosum*, *Andigena*, *Phureja* and *Stenotomum*.
Theor. Appl. Genet., 52, 217-220.
- SCHMIDT-STOHN (G.) et WEHLING (P.). 1983.
Genetic control of esterase isozymes in rye (*Secale cereale* L.).
Theor. Appl. Genet., 64, 109-115.

