

Echanges d'éléments minéraux et carbonés en culture *in vitro* : cas du bananier.

J. MARCHAL, C. TEISSON,
J.V. ESCALANT et L.C. NAVARRO-MASTACHE*

IN VITRO-CULTURES : MINERAL ELEMENT AND CARBOHYDRATE TRANSFERS : THE CASE OF BANANAS.

J. MARCHAL, C. TEISSON, J.V. ESCALANT and L.C. NAVARRO-MASTACHE.

Fruits, Sep. 1988, vol. 43, n° 9, p. 485-490

ABSTRACT - Mineral elements and carbohydrate analysis of plants and culture medium are executed to optimize banana *in vitro*-culture. The MURASHIGE and SKOOG culture medium, generally used, must be enriched with P and K in order to supply the needs of banana *in vitro*-plants.

The mineral element content of plants changes with cultivars. Usually, the more important is light energy or the longer is day light, the larger is plant mineral and dry matter content.

A sucrose hydrolysis in glucose and fructose is noted in medium culture when bananas are growing. The plant carbohydrate content is also varying with cultivars (19 to 27 % of the dry matter). Sucrose is always less important than fructose or glucose in plants.

La technique de multiplication *in vitro* de bananiers est maintenant bien maîtrisée (CRONAUER et KRIKORIAN, 1984 ; BAKRY, 1984 ; BANERJEE et DE LANGHE, 1985). Elle est pratiquée commercialement dans plusieurs pays et en particulier en France (Société VITROPIC près de Montpellier). Elle permet la production continue à grande échelle de matériel végétal, conforme, indemne de parasites et de maladies. Leur utilisation dans de nouvelles zones de culture permet d'éviter l'introduction de nématodes dont la présence hypothéquerait lourdement l'avenir. Dans d'anciennes plantations, leur emploi combiné à la pratique d'une jachère permet de diminuer considérablement le coût des traitements phytosanitaires.

Le transfert au champ des plants se heurte à quelques

* - IRFA/CIRAD - Département fruitier du CIRAD - B.P. 5035
34032 MONTPELLIER CEDEX

Communication présentée au 7^e Colloque sur les Recherches fruitières
Bordeaux, 2-3 décembre 1987.

ECHANGES D'ELEMENTS MINERAUX ET CARBONES EN CULTURE *IN VITRO* : CAS DU BANANIER.

J. MARCHAL, C. TEISSON, J.V. ESCALANT et L.C. NAVARRO-MASTACHE.

Fruits, Sep. 1988, vol. 43, n° 9, p. 485-490

RESUME - Afin d'optimiser les cultures *in vitro* de bananiers, des bilans minéraux et carbonés de milieux de cultures et de plants ont été réalisés.

Le milieu de MURASHIGE et SKOOG, habituellement utilisé, doit être enrichi en phosphore et en potassium afin de satisfaire les besoins de vitro-plants de bananiers.

Les immobilisations des plants en éléments minéraux varient avec les cultivars. Très généralement, plus l'énergie lumineuse fournie durant la culture est élevée, plus les masses sèches et les quantités d'éléments minéraux contenues dans les plants sont importantes. Elles s'accroissent également avec l'augmentation de la durée journalière de l'éclairage.

La culture de vitro-plants de bananiers provoque dans le milieu une hydrolyse du saccharose en fructose et en glucose sous l'influence d'exsudats racinaires. Les quantités de sucres contenues dans les plants varient également avec les cultivars (de 19 à 27 p. 100 de la masse sèche) ; le saccharose est, toujours, quantitativement le moins important par rapport au fructose et au glucose.

difficultés d'acclimatation aux conditions externes. Les plants, cultivés sur un milieu contenant des sucres, ne sont pas initialement autotrophes : une période de transition est nécessaire pour que ce fonctionnement s'établisse. Le passage de l'atmosphère saturée en eau (*in vitro*) à l'atmosphère naturelle peut provoquer un choc d'autant plus important que la régulation hydrique des plants *in vitro* est mauvaise. Des travaux ont été entrepris par l'IRFA/CIRAD afin de réduire ces problèmes (NAVARRO, 1987). Dans cette voie des études sont en cours sur la physiologie des vitro-plants et en particulier sur leur nutrition.

CONDITIONS DE CULTURE

Très généralement, les différentes espèces de bananiers sont cultivées *in vitro* dans des conditions standard d'éclairage et de composition minérale du milieu. Le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) est le plus fréquemment employé. Il est enrichi en particulier en vitamines et addi-

tionné de gélose.

En rapport avec la faible énergie de l'éclairage habituellement fourni (10 W m^{-2}), avec une photopériode de 12 h, la photosynthèse des végétaux en culture *in vitro* est faible (MOUSSEAU, 1986). Le milieu doit donc être enrichi en saccharose (4 g/100 ml) comme source de carbone; ce sucre a également un rôle osmotique (BROWN *et al.*, 1978).

Les cultures sont réalisées en boîte de Pétri (phase de multiplication et de croissance) ou en tube à essai (phase de croissance) à une température de $27^\circ \pm 1^\circ \text{C}$.

Avant d'être réparti dans les boîtes ou tubes de culture, le milieu est autoclavé. L'autoclavage ne modifie pas le pH toutefois une certaine hydrolyse du saccharose en fructose et glucose est observée (effet combiné de la température et du pH relativement acide); la concentration en sucres totaux (tableau 2) mais aussi en éléments minéraux augmente à la suite d'une perte d'eau par évaporation due au chauffage. Si le milieu non ensemencé est conservé dans les mêmes conditions que les milieux en culture, la perte d'eau s'accroît, le pH diminue légèrement et l'hydrolyse du saccharose s'accroît mais reste limitée.

AJUSTEMENT DE LA COMPOSITION DU MILIEU AUX BESOINS DU BANANIER

La culture sur boîte de Pétri (5 implants par boîte et sur 20 ml de milieu), durant un mois, d'implants de bananiers en phase de multiplication ou de croissance sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG provoque un épuisement total du phosphore de celui-ci (tableau 3). Ce résultat est observé quel que soit le clone cultivé (Grande Naine, AA 71, Figue sucrée, BB). Or le phosphore a un rôle physiologique très important, tout particulièrement dans les organes en voie de multiplication. Son insuffisance peut donc avoir un effet limitant sur le développement des vitro-plants.

C'est pourquoi, la concentration du milieu en KH_2PO_4 a été portée de 1,25 à 2,72 millimoles par litre. La culture d'explants en phase de multiplication sur ce milieu enrichi a alors révélé une insuffisance en K (tableau 3).

Lorsque le défaut du phosphore, premier élément limitant est corrigé, d'autres insuffisances peuvent en effet être mises progressivement en évidence. Quantitativement le potassium est l'élément le plus important dans les bananiers adultes (MARTIN-PREVEL *et al.*, 1968; MARCHAL et MALLESSARD, 1979). Les besoins sont-ils proportionnellement identiques pour les bananiers en culture *in vitro*? en phase de croissance après une culture de un mois, la concentration résiduelle du milieu est plus faible en N qu'en K (tableau 3). Ce résultat est régulièrement vérifié (cf. paragraphes suivants). L'équilibre N/K du milieu employé en phase de croissance (N/K = 1 après l'enrichissement de KH_2PO_4) paraît donc convenir mais il doit être corrigé pour la phase de multiplication.

La concentration du phosphore dans le milieu a été insuffisante lorsque 20 ml de milieu sont utilisés pour 5 explants. Il est possible d'augmenter le volume de milieu donc la quantité de P disponible, sans modifier sa concentration. En culture en tubes à essai 10 ml de milieu sont employés pour cultiver un plant. Celui-ci a un développement plus

important qu'en boîte de Pétri et après huit semaines de culture le phosphore du milieu a été totalement épuisé. Les cultures en tubes sont donc réalisées sur milieu enrichi en P et avec un volume de 20 ml assurant une marge de sécurité.

L'enrichissement du milieu en P et K provoque une modification de l'état nutritif des plants (tableau 4) et en particulier un accroissement de la teneur en P. Le niveau de N diminue par dilution dans une masse végétale plus importante. Tout se passe comme si la quantité d'azote absorbée n'avait pas augmenté bien que le milieu ne soit pas épuisé en cet élément. Les formes de l'azote - nitrique et ammoniacale - présentes dans le milieu ne sont probablement pas absorbées indifféremment?

La consommation en sucres par les plants est accrue avec l'enrichissement en P; les milieux sont plus appauvris en fin de culture (tableau 5) et plus en phase de multiplication que de croissance. Dans ces milieux résiduels le saccharose est quantitativement le moins important. Il paraît très probable que des exsudats racinaires (contenant une saccharase?) provoquent dans le milieu, à pH acide, une hydrolyse du saccharose en glucose et fructose; mais il n'est pas possible de savoir par ces analyses si un sucre est absorbé de préférence aux autres.

INFLUENCE DE L'ENERGIE LUMINEUSE FOURNIE ET DE LA PHOTOPERIODE SUR LE COMPORTEMENT DES VITRO-PLANTS

L'énergie lumineuse fournie, la durée de la photopériode journalière, peuvent influencer la croissance et la morphogénèse *in vitro* (GEORGE et SHERRINGTON, 1984). L'influence de ces deux facteurs sur la nutrition de bananiers cultivés *in vitro* a été mesurée avec une photopériode de 12 h. L'accroissement de l'énergie lumineuse fournie provoque une augmentation de la masse des bananiers et des quantités d'éléments minéraux contenues dans ceux-ci (tableau 6). On vérifie que les milieux résiduels sont d'autant plus épuisés en éléments minéraux que l'énergie fournie a été importante (tableau 7.1). Il est également probable que l'absorption des sucres s'est accrue car le milieu est plus pauvre plus l'énergie a été forte (tableau 7.2); donc malgré l'augmentation de cette dernière, les plants restent toujours, au moins partiellement, hétérotrophes.

L'accroissement de la photopériode journalière sous une énergie d'intensité constante (60 W m^{-2}) a aussi une influence positive sur la masse végétale des bananiers et les quantités d'éléments absorbés (tableaux 8 et 9.1). L'épuisement du milieu en sucres est identique avec les périodes 16 h, 8 h et 20 h, 4 h (tableau 9.2) bien que les plants soient plus lourds; on s'interroge sur la possibilité d'une autotrophie plus intense? on remarque (tableau 8) que la teneur en matière sèche des plants est plus faible (donc la teneur en eau est plus importante) avec l'augmentation de la photopériode, est-ce la conséquence d'une photosynthèse?

COMPARAISON DES BESOINS DES CLONES DE BANANIER

La comparaison a porté sur 3 clones diploïdes de bana-

TABLEAU 1 - Composition minérale du milieu de culture de MURASHIGE et SKOOG en millimoles/litre.

| | | | | | |
|---------------------------------------|-------|---|------|--------------------------------------|--------|
| NH ₄ NO ₃ | 20,63 | Fe SO ₄ 7H ₂ O + EDTA | 0,10 | Zn SO ₄ 7H ₂ O | 0,03 |
| K NO ₃ | 18,81 | | | | |
| KH ₂ PO ₄ | 1,25 | Mn SO ₄ 4H ₂ O | 0,10 | NaMoO ₄ 2H ₂ O | 0,001 |
| Ca Cl ₂ 2 H ₂ O | 3,00 | H ₃ BO ₃ | 0,10 | Cu SO ₄ 5H ₂ O | 0,0001 |
| Mg SO ₄ 7H ₂ O | 1,51 | K I | 0,05 | CoCl ₂ 5H ₂ O | 0,0001 |

TABLEAU 2 - Evolution de la composition en sucres du milieu gélosé non ensemencé (g/100 g de milieu).

| | pH | Saccharose | Fructose | Glucose | Sucres totaux |
|-------------------|-----|------------|----------|---------|---------------|
| avant autoclavage | 5,8 | 4,00 | 0,00 | 0,00 | 4,00 |
| après autoclavage | 5,8 | 3,74 | 0,17 | 0,33 | 4,24 |
| après un mois | 5,6 | 3,99 | 0,55 | 0,67 | 5,21 |

TABLEAU 3 - Composition minérale des milieux résiduels, enrichis ou non en P et K, après un mois de culture d'explants de bananiers. (en mg/100 g de milieu gélosé).

| | N | P | K | Ca | Mg |
|---------------------------------|----|-----|------|----|----|
| Milieu de multiplication | | | | | |
| avant enrichissement en P et K | 3 | 0,0 | 11,0 | 9 | 2 |
| après enrichissement en P et K | 8 | 1,5 | 0,0 | 12 | 3 |
| Milieu de croissance | | | | | |
| avant enrichissement en P et K | 23 | 0,0 | 28 | 19 | 5 |
| après enrichissement en P et K | 35 | 5,0 | 62 | 16 | 5 |

TABLEAU 4 - Teneur en éléments minéraux de jeunes bananiers après un mois de culture sur les milieux enrichis ou non en P et K (analyse de bananiers entiers).

| En pourcentage de matière sèche | N | P | K | Ca | Mg |
|---|-----|------|-----|------|------|
| Bananiers en phase de multiplication | | | | | |
| avant enrichissement en P et K | 4,5 | 0,12 | 2,3 | 0,25 | 0 13 |
| après enrichissement en P et K | 4,1 | 0,47 | 4,8 | 0,52 | 0,23 |
| Bananiers en phase de croissance | | | | | |
| avant enrichissement en P et K | 5,0 | 0,18 | 3,7 | 1,10 | 0,21 |
| après enrichissement en P et K | 3,7 | 0,32 | 3,2 | 0 78 | 0 22 |

TABLEAU 5 - Teneur en sucres des milieux résiduels enrichis ou non en P et K, après un mois de culture d'explants de bananiers (g/100 g).

| g/100 g | Saccharose | Fructose | Glucose | Sucres totaux |
|---------------------------------|------------|----------|---------|---------------|
| Milieu de multiplication | | | | |
| avant enrichissement en P et K | 0,9 | 0,7 | 0,7 | 2,3 |
| après enrichissement en P et K | 0,3 | 0,5 | 0,6 | 1,4 |
| Milieu de croissance | | | | |
| avant enrichissement en P et K | 0,7 | 1,5 | 1,3 | 3,5 |
| après enrichissement en P et K | 0,1 | 1,0 | 0,7 | 1,8 |

niers *acuminata* (AA) et *balbisiana* (BB) cultivés dans les mêmes conditions sur 5 ml de milieu gélosé.

Les bananiers du clone *acuminata* rentabilisent mieux les plus faibles quantités de N, P, glucose et fructose absorbés (tableaux 10 et 11) : leurs masses fraîche ou sèche sont les plus importantes. Toutefois, ils contiennent plus d'eau que les *balbisiana* dont la teneur en matière sèche est plus élevée.

L'acidification du milieu est identique avec les 3 clones, très nettement plus intense que celle d'un milieu vierge conservé dans les mêmes conditions. Les variations des teneurs en sucres (tableau 12) avec les 3 clones sont dues d'une part à l'absorption plus ou moins importante par les plants (tableau 11) et, d'autre part, à une consommation d'eau probablement différente. Il n'est pas possible de juger si l'évaporation a été identique. Une disparition presque totale du saccharose est observée avec 2 clones. La consommation de sucres est relativement limitée, 200 mg sont contenus dans les 5 ml de milieu de culture et 30 à 37 mg sont retrouvés dans les tissus. Mais ils représentent de 19 à 27 p. 100 de la matière sèche des plants et une partie des sucres absorbés a pu être accumulée sous une forme plus complexe que celle des 3 sucres identifiés, ou catabolisés

et d'autant plus que la plante est hétérotrophe.

Les contenus minéraux de bananiers Grande Naine (AAA) (tableau 6) et de bananiers AA (tableau 10) sont très proches pour N, P et K. La présence du seul génome A est-elle à l'origine de ce caractère ? Le génome B provoque-t-il, à l'opposé, les différences mesurées avec le clone BB ?

Les proportions relatives de N, P et K ont été calculées dans des bananiers échantillonnés d'une part au champ après 2 mois de culture (MONTAGUT et MARTIN-PREVEL, 1965) et au moment de la récolte (MARCHAL et MALLESSARD, 1979) et, d'autre part, après un mois de culture *in vitro* (tableau 13). Les proportions entre N et P sont très voisines ; par contre en culture *in vitro* le contenu de K est proportionnellement nettement plus faible ; au champ la proportion de K s'accroît progressivement.

Doit-on augmenter la concentration en K du milieu pour tenter d'améliorer son absorption ? Le potassium a un rôle d'activateur général du métabolisme et permet une économie de l'eau en activant la fermeture des stomates (MORARD, 1974). Cette dernière propriété est importante

TABLEAU 11 - Masse de sucres contenue dans un plant de bananier (exprimée en mg) après 36 jours de culture. Influence du clone.

| Clone | Saccharose | Fructose | Glucose | Sucres totaux |
|-------------------|------------|----------|---------|---------------|
| AA 71 | 9,1 | 9,9 | 11,8 | 30,8 |
| Figue sucrée (AA) | 7,8 | 13,3 | 13,9 | 35,0 |
| BB | 5,6 | 15,0 | 16,7 | 37,3 |

TABLEAU 12 - Influence des clones de bananiers sur la composition en sucres du milieu résiduel après une culture de 36 jours.

| Clone | pH | g/100 g | | | Sucres totaux |
|---|-----|------------|----------|---------|---------------|
| | | Saccharose | Fructose | Glucose | |
| AA 71 | 3,5 | 1,6 | 1,2 | 1,4 | 4,2 |
| Figue sucrée (AA) | 3,5 | 0,1 | 1,7 | 1,7 | 3,5 |
| BB | 3,5 | 0,2 | 1,8 | 1,9 | 3,9 |
| Milieu non ensemencé conservé dans les mêmes conditions | 5,6 | 4,0 | 0,6 | 0,7 | 5,3 |

TABLEAU 13 - Proportions relatives du contenu en N, P, K de bananiers entiers cultivés au champ (plants à la récolte des fruits, âgés de 2 mois) ou *in vitro*.

| | | N/P | K/N | K/P |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------|------------------------------------|------|
| | | Grande Naine (AAA) | - au champ 2 mois après plantation | 8,3 |
| | - au champ (à la récolte des fruits) | 9,5 | 3,8 | 35,0 |
| | - <i>in vitro</i> (1 mois) | 10,7 | 1,1 | 9,8 |
| Plantains (AAB) | - au champ (à la récolte des fruits) | 8,6 | 5,8 | 49,5 |
| AA71 | } - <i>in vitro</i> (1 mois) | 9,2 | 1,1 | 8,3 |
| Figue sucrée (AA) | | 8,9 | 0,9 | 8,3 |
| BB | | 9,6 | 0,8 | 8,6 |

dans l'optique de la limitation du stress hydrique au moment du transfert des plants en culture à l'air libre.

CONCLUSION

Ces travaux concernant les échanges nutritionnels en culture *in vitro* sont encore très restreints et préliminaires. Les besoins sont très certainement fonction des espèces - sinon des clones. Les conditions de culture doivent être adaptées afin de rendre les plantes plus robustes et d'améliorer leur autotrophie. Cette amélioration permettrait d'envisager très probablement une simplification des techniques de culture et d'obtenir des plants moins sensibles au choc de la transplantation.

Ces premiers résultats fournissent des informations mais ils conduisent surtout à tenter de mieux connaître le comportement physiologique des bananiers et d'autres espèces dans les conditions de la culture *in vitro* : échanges gazeux, métabolisme des sucres, besoins en énergie ...

BIBLIOGRAPHIE

- BAKRY (F.). 1984.
Application des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration du bananier (*Musa sp.*).
Thèse, Université Paris Sud, Centre d'Orsay.
- 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.
- BROWN (D.), LUENG (D.) et THORPE (T.). 1978.
Role of sucrose as an osmotic agent during shoot formation in tobacco callus.
Congress Calgary, Abstract 141.
- CRONAUER (S.S.) et KRIKORIAN (A.D.). 1984.
Multiplication of *Musa* from excised stem tips.
Annals of Botany, 53, 321-328.
- GEORGE (E.F.) et SHERRINGTON (P.D.). 1984.
Plant propagation by tissue culture.
Handbook and Directory of Commercial Laboratories, p. 125-183. Exegetics Ltd. Hants England.
- MARCHAL (J.) et MALLESSARD (R.). 1979.
Comparaison des immobilisations minérales de quatre cultivars de bananiers à fruits pour cuisson et deux 'Cavendish'.
Fruits, 34 (6), 373-392.
- MARTIN-PREVEL (P.), LACOEUILHE (J.J.) et MARCHAL (J.). 1968.
Les éléments minéraux dans le bananier 'Gros Michel' au Cameroun.
Fruits, 23 (5), 259-269.
- MONTAGUT (G.) et MARTIN-PREVEL (P.). 1965.
Essais sol-plante sur bananiers. Besoins en engrais des bananeraies antillaises.
Fruits, 20 (6), 265-281.
- MORARD (P.). 1974.
Rôles physiologiques du potassium chez les végétaux.
Revue de la Potasse, n° 10.
- MOUSSEAU (M.). 1986.
CO₂ enrichment *in vitro*. Effect on autotrophic and heterotrophic cultures of *Nicotiana tabacum* (var. Samsun).
Photosynthesis Research, 8, 187-191.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.
A revised medium for rapid growth and bio assays with tissue cultures.
Physiologia Plantarum, 15 473-497.
- NAVARRO (L.L.). 1987.
Incidence des facteurs de croissance *in vitro* sur le transfert des plants de bananiers cv. Petite Naine.
DEA IRFA/CIRAD, ENSA Toulouse, 84 p.
- AUSTAUSCH VON MINERAL- UND KOHLENSTOFFEN IN EINER VITRO-KULTUR : VERDEUTLICHT AN DER BANANENPFLANZE.
J. MARCHAL, C. TEISSON, J.V. ESCALANT und L.C. NAVARRO-MASTACHE.
Fruits, Sep. 1988, vol. 43, n° 9, p. 485-490.
- KURZFASSUNG - Zur Optimierung der Bananen-*in vitro*-Kulturen sind über einschlägige Anbau- und Keimpflanzenmedien Mineral- und Kohlenstoffbilanzen worgenommen worden. Das Medium von MURASHIGE und SKOOG, das gewöhnlich verwendet wird, muss zur Bedarfsdeckung der Bananen-Vitro-Pflanzen mit Phosphor und Kalium angereichert werden. Die Immobilisierung von Mineralstoffen un den Pflanzen schwankt je nach Cultivar. Je höher die Lichtenergie während der Kultur, desto stärker der Gehalt an Trockenmasse und Mineralstoffen in der Pflanze. Dieser Gehalt steigt ebenfalls bei längerer täglicher Lichteinwirkung. Die Kultur von Bananen-Vitropflanzen führt im Medium unter den Einfluss von Wurzelexsudaten zur Hydrolyse der Saccharose in Fruktose und Glukose. Das Zuckeraufkommen in den Pflanzen richtet sich ebenfalls nach den einzelnen Cultivaren (zwischen 19 und 27 % der Trockensubstanz); von der Menge her ist Saccharose immer weniger vorhanden als Fruktose und Glukose.
- INTERCAMBIOS DE ELEMENTOS MINERALES Y CARBONOS EN CULTIVO *IN VITRO* : CASO DEL BANANO.
J. MARCHAL, C. TEISSON, J.V. ESCALANT y L.C. NAVARRO-MASTACHE.
Fruits, Sep. 1988, vol. 43, n° 9, p. 485-490.
- RESUMEN - A fin de optimizar los cultivos *in vitro* de bananos, se han realizado balances minerales y carbonados de medios de cultivos y de plantas. El medio de MURASHIGE y SKOOG, utilizado habitualmente, debe enriquecerse en fósforo y en potasio a fin de satisfacer las necesidades de vitro-plantas de bananos. Las inmovilizaciones de las plantas en elementos minerales varían con los cultivares. En general, cuanto más alta es la energía luminosa suministrada durante el cultivo, más importantes son las cantidades de elementos minerales contenidas en las plantas. Se acrecientan también con el aumento de la duración cotidiana de la iluminación. El cultivo de vitro-plantas de bananos provoca en el medio una hidrólisis de la sacarosa en fructosa y en glucosa bajo la influencia de las exudaciones de las raíces. Las cantidades de azúcares contenidas en las plantas varían también con los cultivares (de 19 a 27 por 100 de la masa seca) ; la sacarosa es, siempre, cuantitativamente la menos importante en relación con la fructosa y la glucosa.

