

Micropropagation *in vitro* du bananier.

F. COTE, D. ALVARD, R. DOMERGUE,
L. NAVARRO-MASTACHE et C. TEISSON

La multiplication *in vitro* conforme du bananier est classiquement réalisée par bourgeonnement axillaire et/ou adventif (figure 1). Les recherches du laboratoire de culture *in vitro* de l'IRFA sur la micropropagation ont pour objectif de développer la maîtrise de la production de vitroplants à grande échelle : amélioration de la qualité des plants, augmentation de leur rapidité de développement, diminution de leur coût de production. Le programme de recherche comprend trois principaux thèmes :

- I.- Micropropagation du bananier en milieu liquide.
- II.- Amélioration de la multiplication *in vitro* du bananier

plantain.

- III.- Bioclimatologie des cultures *in vitro* de bananier.

Nous présenterons quelques résultats marquants obtenus au cours de ces études.

MICROPROPAGATION *IN VITRO* DU BANANIER EN MILIEU LIQUIDE

Un milieu de culture contient de l'eau, des éléments minéraux, une source de carbone, différents régulateurs de

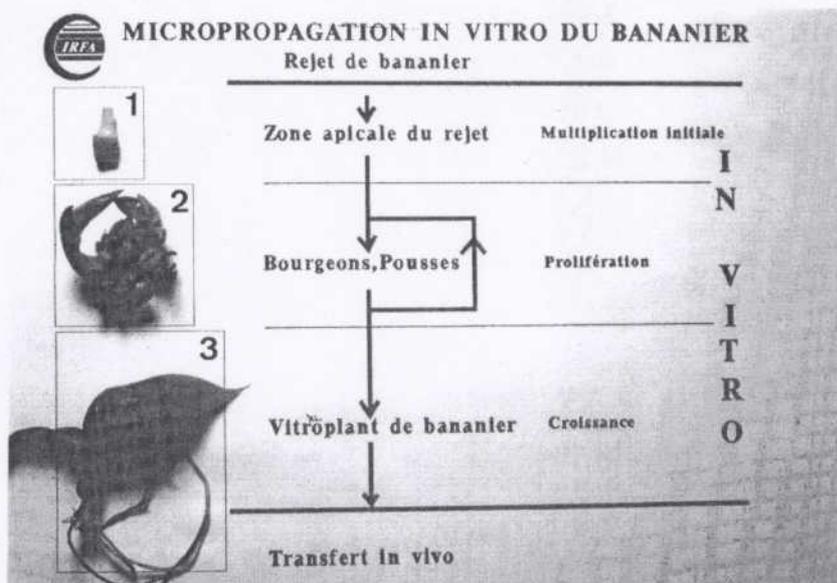


FIGURE 1 - Schéma de la micropropagation *in vitro* du bananier par bourgeonnement axillaire et adventif.

La zone apicale d'un rejet de bananier (photo 1) est placée sur un milieu de multiplication initiale [Murashige et Skoog (MS) + cytokinine]. Après 2 mois de culture 4 à 8 bourgeons (explants sans feuille apparente) ou pousses (explant avec feuilles) sont produits par rejet.

La multiplication des bourgeons et pousses réunis en touffe de prolifération (photo 2) a une durée moyenne d'un mois (milieu de MS + cytokinine). Le taux de prolifération mensuel (nombre final d'explants/nombre initial) des bananiers du groupe Cavendish est compris entre 1,5 et 3.

Sur un milieu de croissance (MS) sans hormone végétale les pousses se développent en «bananiers» (explants avec feuilles et racines, également appelés vitroplants, photo 3) qui après un mois de culture sont transférés *in vivo* en phase d'acclimatation.

croissance et vitamines. Habituellement, ce milieu est solidifié par un agent gélifiant. Par rapport à un milieu solidifié, un milieu liquide offre la possibilité de pouvoir être renouvelé ou modifié en cours de culture, stérilisé par filtration, facilement échantillonné pour analyse. L'utilisation d'un tel milieu doit donc permettre une plus grande maîtrise de la production industrielle de vitroplants. Dans une première étude, nous avons testé la possibilité de réaliser la micropropagation du bananier en milieu liquide à l'échelle du laboratoire.

Multiplication et croissance du bananier en milieu liquide.

Le développement de vitroplants en milieu liquide n'est possible que s'ils ne sont pas en conditions d'asphyxie. Au cours d'une étude préliminaire, différentes techniques de culture permettant une immersion temporaire des plants ont été testées. Le système expérimental retenu est composé de deux conteneurs, le milieu est transféré vers les plants par air comprimé à raison de 12 immersions de 20 mn par 24 heures.

Le tableau 1 présente quelques caractéristiques des phases successives de multiplication de bananiers (var. Poyo) en milieu liquide. Le taux de prolifération est de 4 à 5 par cycle de 20 jours, les deux tiers des explants obtenus (bourgeons et pousse < 1 g) pouvant être remis en culture pour une nouvelle phase de multiplication. En production à grande échelle en milieu solide, le taux de multiplication des bananiers du groupe Cavendish est de 1,5 à 3. Il faut cependant prendre en compte que les deux techniques de multiplication diffèrent par des paramètres autres que le type de milieu, liquide ou solide.

Le tableau 2 présente les caractéristiques d'une phase de croissance en milieu liquide. Le passage de la phase de multiplication à cette phase de croissance a été effectué par simple transfert de milieu sans préparation des explants. Le nombre de bananiers sevrables (explants enracinés de masse de matière fraîche supérieure à 1 g) après 20 jours de culture, est voisin du nombre initial de pousses mises en croissance. Ce résultat illustre l'intérêt de l'utilisation du milieu liquide pour réduire les manipulations au cours des différentes phases de la micropropagation.

La poursuite de ces travaux préliminaires a pour objectifs de réaliser un système de culture en milieu liquide utilisable en production industrielle et d'optimiser les techniques de micropropagation dans ces conditions (fréquence de renouvellement et composition du milieu de culture ...).

AMELIORATION DE LA MULTIPLICATION *IN VITRO* DU BANANIER PLANTAIN

Le taux de multiplication *in vitro* des bananiers plantain est en règle générale plus faible que celui des bananiers dessert (figure 2). L'augmentation de la concentration en cytokinine au dessus de la valeur standard (2 mg/l) pourrait être un moyen de favoriser la multiplication. Cette méthode n'est cependant pas utilisée au laboratoire car elle est suspectée de favoriser l'apparition de vitroplants non conformes. Dans une série d'expérimentations, nous avons étudié différents protocoles de culture visant à augmenter la prolifération du bananier plantain et utilisant des concentrations standards de cytokinine.

TABLEAU 1 - Caractéristiques de phases de multiplication successives de bananiers (var. Poyo) en milieu liquide (moyenne de 5 répétitions par cycle de 20 jours, 20 explants initiaux par répétition ; * : écart type des moyennes des 5 répétitions ; «bourgeons», «pousses» : voir définition sur la figure 1) (ALVARD, 1989).

cycle de prolifération	1	2	3
taux de prolifération	5.2±0.7 *	4.1±0.3	4.3±0.4
bourgeons	42.6±3.9	29.6±4.3	44.4±7.8
répartition des explants obtenus (p. 100)			
pousses	57.4±3.9	70.4±4.0	55.5±7.8

TABLEAU 2 - Caractéristiques d'une phase de croissance de bananiers (var. Poyo) en milieu liquide. Le passage de la phase de multiplication à celle de croissance est réalisé dans cette expérience par transfert de milieu liquide sans qu'intervienne de manipulation des explants (moyenne de 5 répétitions, 20 explants initiaux par répétition ; «bourgeons», «pousses», «bananiers» : voir définition sur la figure 1). (ALVARD, 1989).

	Nombre	Répartition des explants		
		Bourgeons	Pousses	Bananiers
Explants initialement placés sur milieu de croissance	20	8,5	11,5	
Explants obtenus en fin de croissance (cycle de 20 jours)	46	25	7,5	13,5

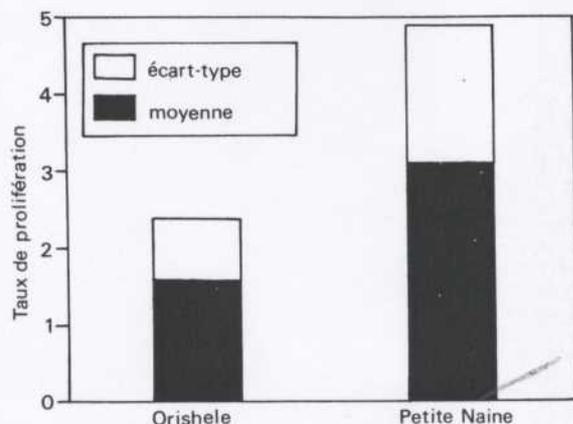


FIGURE 2 - Comparaison du taux de multiplication mensuel de bananiers plantain Orishele et bananiers dessert Petite Naine (DOMERGUE, 1989). Observations réalisées sur 30 explants par traitement).

Effet du type de préparation de l'explant lors de la mise en culture sur le taux de prolifération du bananier plantain var. Orishele.

Plusieurs protocoles de culture visant à améliorer la multiplication ont été testés et n'ont pas donné de résultats positifs (utilisation de différents régulateurs de croissance à effet cytokinique, modification des conditions d'aération du conteneur de culture, utilisation d'inhibiteur de la synthèse d'éthylène). Une augmentation significative du taux de prolifération a, par contre, été obtenue en modifiant la dominance apicale de l'explant par incision du méristème. Cette technique est déjà utilisée par le laboratoire de culture *in vitro* de l'ITA [VUYLSTECKE, DR (1989) - Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. International Board for plant genetic Resources, Rome]. La figure 3 représente les taux de prolifération mensuels de bananiers plantain Orishele et bananiers dessert Petite Naine en fonction du type de préparation de l'explant. Une incision en croix de l'explant (technique du « quart de bananier ») au début de la phase de

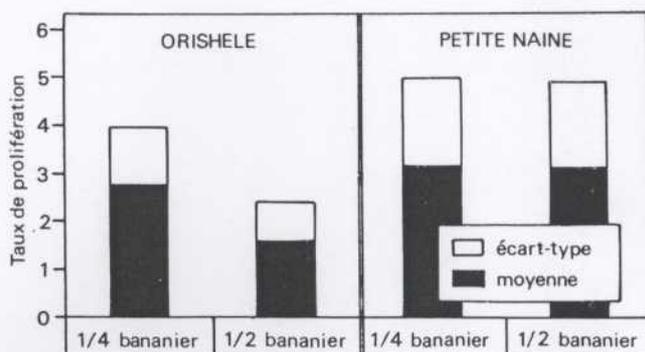


FIGURE 3 - Comparaison du taux de multiplication mensuel de bananiers plantain Orishele et bananiers dessert Petite Naine en fonction du type de préparation de l'explant (DOMERGUE, 1989); la technique « quart-bananier » correspond à une incision de l'explant initial en 4 parties restant attachées par la base; dans la technique standard du « demi-bananier », l'explant est séparé en deux parties; observations réalisées sur 30 explants par traitement.

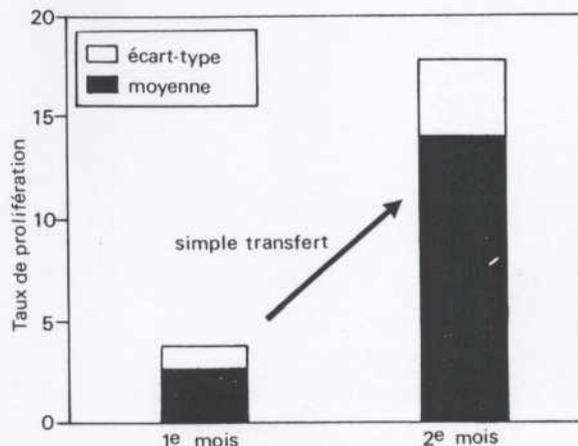


FIGURE 4 - Multiplication de bananiers plantain Orishele au cours de cycles successifs de prolifération (DOMERGUE, 1989).

Le taux de prolifération est le cumul de la multiplication intervenue après 1 et 2 mois de culture.

multiplication conduit, pour la variété Orishele, à un taux de multiplication 1,6 fois supérieur à celui obtenu par la technique de mise en culture classique de demi-bananier.

A l'issue d'une phase de prolifération faisant suite à une incision en croix de l'explant, un ensemble de pousses et bourgeons (touffe de prolifération) est obtenu. Un transfert direct de ce matériel végétal sur un nouveau milieu conduit à un taux de prolifération voisin de 14 sur l'ensemble des deux cycles successifs de multiplication (figure 4).

La poursuite du travail a pour objectif de préciser, pour les deux variétés de bananier étudiées, les modifications de dominance apicale induites par une blessure du méristème, l'origine des bourgeons formés après cette intervention. On déterminera également si le taux élevé de bourgeonnement observé au deuxième cycle de prolifération se maintient après des phases successives de multiplication ou s'il est nécessaire après plusieurs cycles de rétablir une structure de touffe de prolifération par une incision en croix des explants.

**BIOCLIMATOLOGIE DES CULTURES *IN VITRO*
DE BANANIER
INCIDENCE DE LA LUMIERE
ET DES ECHANGES GAZEUX**

En culture *in vitro*, le matériel végétal est soumis à un environnement bioclimatique (température, éclairage, concentration de gaz carbonique, oxygène, vapeur d'eau) très différent de celui des conditions naturelles. L'influence de ces conditions sur le développement des plants n'a pas encore fait l'objet d'études approfondies. Les informations de la bibliographie font cependant pressentir l'importance de cet environnement sur le développement *in vitro*. Un programme de recherche sur la bioclimatologie des vitroplants de bananier est développé au laboratoire de culture *in vitro* de l'IRFA. Les objectifs de ce programme consistent à : a) caractériser les conditions bioclimatiques habituelles de micropropagation ; b) déterminer l'effet de la modification des paramètres éclairage et concentrations gazeuses pendant la phase *in vitro* sur le développement des plants.

Caractérisation des conditions bioclimatiques (éclairage et concentrations gazeuses) des protocoles habituels de culture *in vitro*.

● Eclairage.

L'éclairage des salles de culture *in vitro* présente les principales caractéristiques suivantes :

- l'éclairage des tablettes de culture est classiquement assuré par 2 à 5 tubes fluorescents de type industriel. L'intensité lumineuse moyenne obtenue au niveau du végétal est de l'ordre de $50 \mu \text{ E.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (PAR) soit 2,5 p. 100 de l'intensité du rayonnement PAR solaire au zénith,

- le spectre d'émission des tubes fluorescents est compris dans les bandes du vert-jaune-orange. Des tubes du type GroLux peuvent être employés pour enrichir le spectre en radiations rouges.

La faible intensité et le déficit en radiations bleues et rouges par rapport à l'éclairage naturel ont comme conséquence probable une limitation de l'activité photosynthétique et une perturbation des processus de photomorphogénèse.

● Concentrations gazeuses.

La composition de l'atmosphère à l'intérieur du récipient de culture dépend de l'activité métabolique du végétal et des caractéristiques de perméabilité au gaz du type de fermeture employée. De multiples combinaisons de concentrations gazeuses sont donc possibles en fonction du type de culture, de son stade de développement, du récipient utilisé. Les concentrations en gaz carbonique, oxygène, éthylène au cours de la micropropagation du bananier présentent les caractéristiques suivantes :

Gaz carbonique : la respiration du matériel végétal est responsable d'une augmentation de la concentration de CO_2 jusqu'à des valeurs de plusieurs pourcents (en phase nocturne ou lorsque le matériel végétal est non-chlorophyl-

lien). A la lumière, la fixation photosynthétique de CO_2 abaisse la concentration de ce gaz au point de compensation. A titre d'exemple, au cours d'une même photopériode, des concentrations de CO_2 de 100 à 200 fois la concentration naturelle sont fréquentes de nuit chez le bananier en phase de croissance ; pendant la première partie du jour, la concentration diminue puis se stabilise à des valeurs inférieures à la concentration atmosphérique.

Oxygène : Un conteneur clos ne permet pas le renouvellement de l'oxygène consommé par la respiration. En 15 à 20 jours par exemple, chez le bananier en phase de prolifération, la concentration d' O_2 diminue jusqu'à des valeurs de 2 p. 100 (explants non chlorophylliens).

Vapeur d'eau : l'évaporation du milieu de culture et le faible gradient de température à l'intérieur du conteneur ont pour conséquence une augmentation de l'hygrométrie jusqu'à des valeurs supérieures à 95 p. 100 de la saturation.

Ethylène : le confinement de la culture conduit à l'accumulation de composés volatils dégagés par la plante. Des concentrations d'éthylène de plusieurs $\mu\text{l.l}^{-1}$ sont couramment observées dans les conteneurs utilisés pour la micropropagation du bananier.

Ces particularités de l'atmosphère des cultures *in vitro* ont les conséquences suivantes sur le métabolisme de la plante :

- perturbation du métabolisme photosynthétique par excès ou déficit de CO_2 ,

- perturbation du métabolisme énergétique respiratoire par hypoxie ou anoxie,

- limitation des flux hydriques de la plante due à une hygrométrie saturante,

- perturbation de la morphogénèse et des métabolismes énergétiques dus à l'accumulation d'éthylène.

Cette rapide description de l'éclairage et de la composition de l'atmosphère des cultures *in vitro* souligne que ces deux paramètres bioclimatiques sont éloignés des conditions naturelles, non régulés et limitants pour des processus physiologiques majeurs.

Effet de l'intensité lumineuse sur le développement de vitroplants de bananier.

Les effets d'une augmentation de l'intensité lumineuse ($350 \mu \text{ E.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ par rapport à l'éclairage témoin de $50 \mu \text{ E.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sur différents aspects du développement de vitroplants de bananiers sont résumés dans le tableau 3. A forte intensité lumineuse, l'accumulation de matière sèche après 30 jours de croissance *in vitro* est de 1,7 à 2 fois supérieure à celle observée sous faible intensité. Cette stimulation de la croissance est accompagnée de changements morphologiques allant dans le sens d'une plus grande vigueur des vitroplants. L'anatomie de la feuille sous fort éclairage se rapproche de celle d'une feuille émise *in vivo*. A un éclairage élevé, l'augmentation de la concentration de chlorophylles par rapport au témoin (tableau 3) et la fixation rapide en début de jour du CO_2 d'origine

TABLEAU 3 - Effets de l'intensité lumineuse et des conditions d'aération du conteneur de culture sur différents aspects du développement *in vitro* de bananiers (observations réalisées sur 50 vitroplants par traitement) (NAVARRO MASTACHE, 1989).

(l'aération du conteneur de culture est obtenue en plaçant sur ce conteneur un filtre Millipore FG 0,2 μ) ; * a, b, c groupe de moyennes non significativement différentes au risque de 5 p. 100).

Intensité de l'éclairément Type d'aération	50 μ E.m ⁻² .s ⁻¹		350 μ E.m ⁻² .s ⁻¹	
	sans aération	avec aération « passive »	sans aération	avec aération « passive »
aspect des plants	plante étiolée, feuilles allongées pseudotige fine, peu de racines, symptôme d'épinastie		à fort éclairément + aération, la surface foliaire est augmentée, la coloration des feuilles est verte franche	
anatomie foliaire	tissu pallissadique : 1 couche de cellules arrondies contenant des proplastés		- développement de l'hypoderme favo- risé à fort éclairément - tissu palissadique : 2 à 3 couches de cellules allongées contenant des chloro- plastés - développement des faisceaux vascu- laires favorisés à fort éclairément	
concentration en éthylène (μ l.l ⁻¹) après 30 jours de croissance <i>in vitro</i> en conteneur de 0,5 l - 5 plants/conteneur	2,5 à 3	0,2	2,5 à 3	0,5
teneur en chlorophylle par unité de masse de matière sèche après 30 jours <i>in vitro</i> (unité arbitraire)	1 (b) *	1,2 (b)	1,5 (b)	4,7 (a)
croissance <i>in vitro</i> : masse de matière sèche après 30 jours (unité arbitraire)	1 (c)	0,9 (c)	1,7 (b)	2 (a)
développement en phase d'acclimatation : surface foliaire après 30 jours <i>in vivo</i> (unité arbitraire)	1 (b)	1 (b)	1 (b)	1,4 (a)

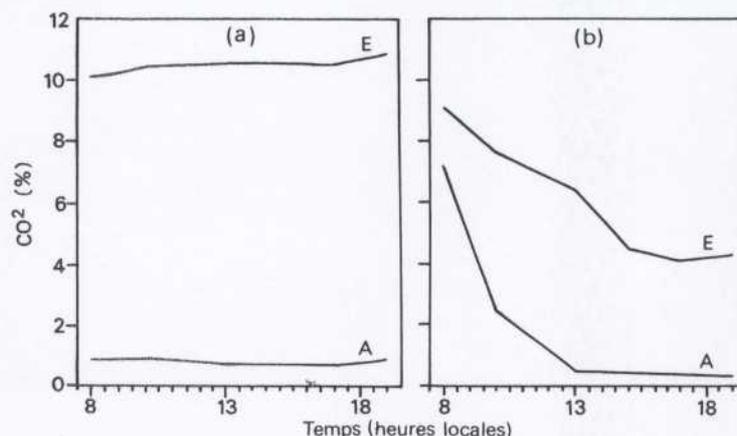


FIGURE 5 - Evolution de la concentration de CO₂ au début du jour dans des récipients de culture contenant des bananiers (var. Petite Naine) en phase de croissance *in vitro*. Effet de l'intensité de l'éclairément et de la nature des échanges gazeux entre récipient et atmosphère (NAVARRO-MASTACHE, 1989).

Figure 5 a : croissance à 45 μ mol m⁻² s⁻¹
Figure 5 b : croissance à 340 μ mol m⁻² s⁻¹

E : récipient étanche ; A : récipient muni d'un filtre de 0,2 μ micromètres permettant les échanges gazeux avec l'atmosphère ; volume du récipient : 0,4 l, 5 explants par récipient.

Les concentrations élevées de CO₂ en début de jour sont la conséquence de l'accumulation de CO₂ d'origine respiratoire pendant la phase nocturne. La rapidité de la diminution de la concentration de CO₂ dépend des capacités photosynthétiques des vitroplants.

respiratoire accumulé pendant la nuit (figure 5) traduisent des capacités photosynthétiques plus élevées du vitroplant. La stimulation de croissance sous forte intensité lumineuse en conteneur étanche n'est cependant pas attribuable à une fixation autotrophique de CO₂ puisqu'en absence de renouvellement de l'atmosphère, la quantité de CO₂ présente

dans le récipient de culture est négligeable par rapport au gain de masse des vitroplants. (A la mise en culture, la concentration de CO₂ est de l'ordre de 500 μ l.l⁻¹. Le récipient de 0,5 l classiquement utilisé pour la micropropagation contient donc moins d'un millilitre de CO₂ disponible pour les plants).

Effet de la modification de l'environnement gazeux du conteneur de culture sur le développement de vitro-plants de bananier.

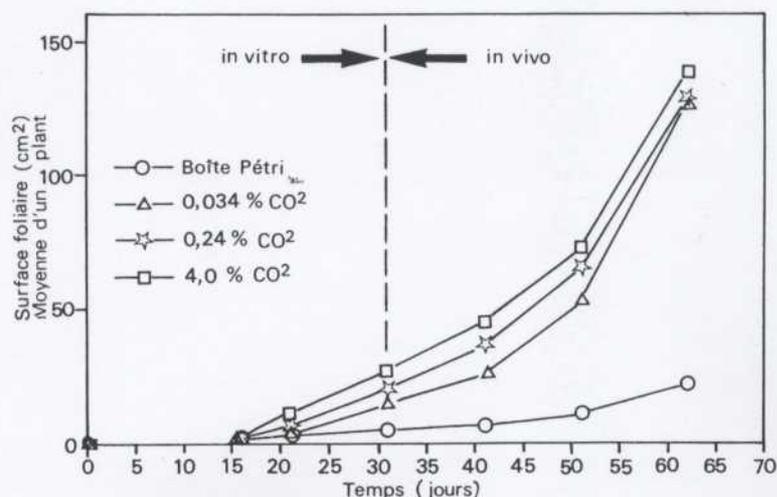
- Effet de l'aération simple du conteneur de culture.

Les effets de l'utilisation d'un conteneur de culture permettant les échanges gazeux avec l'atmosphère (conteneur muni d'un filtre $0,2\mu$ à aération dite « passive ») sur le développement *in vitro* de plants de bananiers sont présentés sur le tableau 3.

L'effet de l'aération du conteneur est peu marqué lorsque l'intensité de l'éclairage est faible. A forte intensité lumineuse, l'aération favorise l'accumulation de matière sèche, le développement foliaire (tableau 3), les capacités de photosynthèse (figure 5). L'avance de croissance *in vitro* avec le traitement forte intensité lumineuse + aération « passive » se maintient après transfert des plants *in vivo* en phase d'acclimatation (tableau 3). Il est probable que l'effet « positif » de l'aération passive soit lié à l'élimination de l'éthylène accumulé en conteneur étanche (tableau 3). L'aération pourrait également agir en diminuant l'humidité relative de l'atmosphère *in vitro* ce qui favoriserait les flux hydriques de la plante. Le gain de croissance *in vitro* en conteneur aéré n'est pas attribuable à un effet trophique de fixation photosynthétique de CO_2 provenant de l'extérieur du flacon car il est maintenu lorsque le filtre d'aération est associé à une membrane imperméable au CO_2 . L'augmentation des potentialités de photosynthèse (recyclage de CO_2 d'origine respiratoire) en conteneur aéré pourrait cependant influencer le développement de façon indirecte (par mise en place d'une régulation stomatique, rééquilibrage rapide en début de jour de la teneur d'oxygène). Ces hypothèses sont en cours d'étude.

- Effet d'un enrichissement en CO_2 sur le développement de vitroplants de bananier.

Les expériences d'aération « passive » du conteneur de



Les plants des trois traitements avec apport de CO_2 sont placés en phase de croissance *in vitro* (0 à 31 jours) sous un éclairage de $400 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$. La croissance des bananiers témoins a lieu dans les conditions habituelles de production de vitroplants à grande échelle : en boîte de Pétri et sous un éclairage de $50 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$. La phase d'acclimatation *in vivo* (31 à 62 jours) a lieu pour tous les traitements en serre tropicalisée.

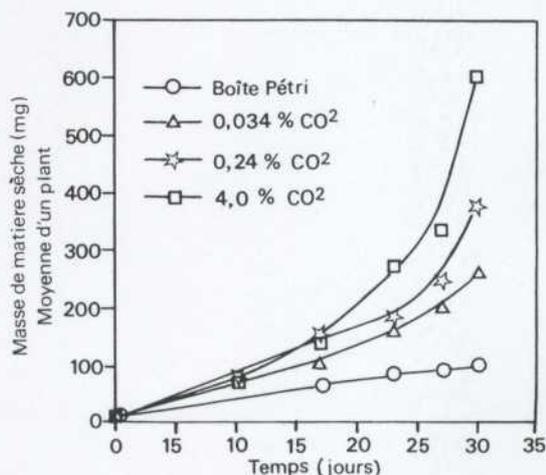


FIGURE 6 - Evolution de la masse de matière sèche de plants de bananiers (var. Petite Naine) en phase de croissance *in vitro*. Effet d'un balayage du conteneur de culture par de l'air à différentes concentrations de CO_2 (NAVARRO-MASTACHE, 1989).

Les plants des trois traitements avec apport de CO_2 sont placés en phase de croissance *in vitro* sous un éclairage de $400 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$. La croissance des bananiers témoins a lieu dans les conditions habituelles de production de vitroplants à grande échelle : en boîte de Pétri et sous un éclairage de $50 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

culture ont révélé les potentialités de fixation autotrophique de CO_2 par des vitroplants de bananier placés sous un éclairage élevé : le CO_2 issu de la respiration nocturne est refixé en quelques heures. Cependant, après épuisement de ce CO_2 , la plante se trouve au point de compensation pour le restant de la phase éclairée. Dans une série d'expérimentations, l'atmosphère du conteneur de culture a été balayée sur l'ensemble de la photopériode par de l'air à différentes concentrations de CO_2 . L'accumulation de

FIGURE 7 - Evolution de la surface foliaire de bananiers (var. Petite Naine) en phase de croissance *in vitro* et après transfert *in vivo*. Effet d'un balayage de conteneur de culture par de l'air à différentes concentrations de CO_2 . (NAVARRO-MASTACHE, 1989).

matière sèche *in vitro* des plants soumis à ces traitements (0,034 p. 100 de CO₂, 0,24 p. 100, 4 p. 100 correspondant respectivement à la concentration naturelle de CO₂, à la concentration saturante pour l'enzyme de carboxylation et à une concentration de CO₂ fréquemment observée *in vitro* en conteneur étanche) est représentée sur la figure 6. Cette croissance est comparée à celle des plants obtenus dans les conditions habituelles de micropropagation à grandes échelles (en boîte de Pétri, sous un éclairage de 50 μ E.m.⁻².s⁻¹). L'apport de CO₂ permet d'obtenir après 30 jours de culture *in vitro* une accumulation de matière sèche de 2 à 6 fois supérieure à celle du témoin (figure 6).

L'avance de développement acquise *in vitro* dans les traitements avec enrichissement en CO₂ est maintenue *in vivo* après transfert en phase d'acclimatation (figure 7). Entre les différents traitements avec apport de CO₂ il n'existe cependant plus, après 30 jours d'acclimatation, de différence significative de développement. La suite des expériences a pour objectif de déterminer les capacités photosynthétiques des plants en fonction des conditions bioclimatiques qu'ils subissent *in vitro* et de tester les possibilités de réaliser la phase de croissance *in vitro* en autotrophie complète.

Les résultats précédents montrent que les paramètres bioclimatiques habituels des cultures *in vitro* sont des facteurs limitants de la croissance et de la morphogénèse. Les premières observations indiquent que ces limitations interviennent directement sur le métabolisme primaire de la plante. La compréhension plus précise des phénomènes nécessiterait une analyse des métabolisme énergétique, photosynthétique à divers niveaux d'organisation du végétal *in vitro*.

Dans le cadre de recherches appliquées, l'intérêt d'un contrôle des paramètres bioclimatiques de la micropropagation peut intervenir : a) *in vitro* au niveau de la facilité et de la rapidité de production ; b) *in vivo* pour la facilité et rapidité de développement des plants en phase d'acclimatation. Compte tenu des différences de morphologie et d'anatomie foliaire présentées par les bananiers issus des divers protocoles de micropropagation, il serait également intéressant d'évaluer *in vivo* les capacités de résistance aux pathogènes (CMV ...) des différents «types» de vitroplants. La quantification précise au laboratoire et au champ des avantages que permet le contrôle des conditions bioclimatiques *in vitro* doit se poursuivre pour définir les nouveaux protocoles de production industrielle de vitroplants.