

Croissance *in vitro* des bananiers (cv. *Grande naine*) Etude de la consommation de la source carbonée et des principaux éléments minéraux du milieu de culture

M. FOLLIOU* et J. MARCHAL*

In vitro growth of banana : Study on the utilization of the carbon source and the main mineral elements of the medium (cv. *Grande naine*).

M. FOLLIOU and J. MARCHAL

Fruits, vol. 47, n°5, p. 565-571.

SUMMARY - Various elements likely to improve medias are tested for their influence on the *in vitro* growth phase of banana i.e. glucides added to the medium (saccharose or fructose), saccharose concentrations of the medium (40 or 80 g/l) and plants densities (50 or 100 plants per box). The results show the positive action on plants growth of an increase in the saccharose quantity provided to banana and of the utilization of the fructose as carbon source.

Croissance *in vitro* des bananiers : étude de la consommation de la source carbonée et des principaux éléments minéraux du milieu de culture (cv. *Grande naine*).

M. FOLLIOU et J. MARCHAL

Fruits, vol. 47, n°5, p. 565-571.

RESUME - Différents éléments susceptibles d'améliorer les conditions et milieux de culture sont testés pour leur influence sur la croissance *in vitro* de bananiers : forme des glucides ajoutés au milieu (saccharose ou fructose), concentrations en saccharose de ce milieu (40 ou 80 g/l) et densités de plants (50 ou 100 plants par boîte). Les résultats obtenus mettent en évidence l'action positive sur la croissance des plants, d'une augmentation de la quantité de saccharose mise à la disposition des bananiers, de l'utilisation du fructose comme source carbonée et de la moindre densité des plants dans les boîtes.

KEYWORDS : *Musa acuminata*, micropropagation, *in vitro* culture, carbon, sugars, growth, growing media, plant nutrition

MOTS CLES : *Musa acuminata*, micropropagation, culture *in vitro*, carbone, sucres, croissance, substrat de culture, nutrition des plantes

Introduction

Au cours de la micropropagation du bananier, réalisée par bourgeonnement axillaire et adventif, 3 phases de culture *in vitro* sont communément distinguées (TEISSON, 1987; DOMERGUE, 1990) :

- l'établissement d'une culture aseptique à partir de l'apex d'un rejet (stade I ou phase d'initiation),
- la multiplication des bourgeons en présence de cytokinine (stade II ou phase de prolifération),
- la croissance et l'enracinement des plantules (stade III ou phase de croissance).

A l'issue de cette dernière phase, les plants sont repiqués en conteneurs et placés en phase de sevrage *in vivo* appelée également phase d'acclimatation.

La micropropagation de bananier et d'ananas sur des milieux contenant 40 g/l de saccharose révèle que, au cours de la phase de croissance *in vitro* (stade III), la masse de matière sèche des plants ne croît pas selon une courbe exponentielle (COTE, comm. pers., figure 1). Il existerait donc, dans de telles conditions de culture, des facteurs limitant la croissance des plants.

L'influence de la nutrition minérale et carbonée sur le développement des plants *in vitro* a déjà été mise en évidence (SENS, 1988). Mais d'autres facteurs limitants tels que l'environnement gazeux (gaz carbonique, éthylène), l'intensité lumineuse ou la qualité de l'éclairage ont également fait l'objet d'études approfondies (NAVARRO, 1990).

S'appuyant sur ces résultats, le premier objectif des travaux présentés dans ce document a été de préciser l'effet de la composition du milieu de culture en éléments minéraux et

* CIRAD-FLHOR, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

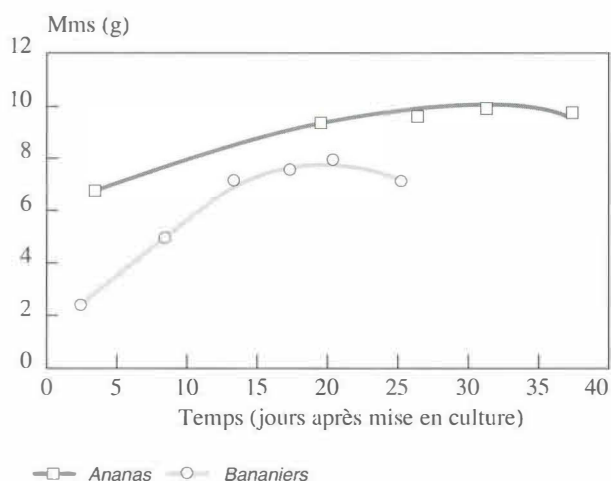


Figure 1. Evolution de la masse de matière sèche (Mms) totale de 100 plants de bananiers et d'ananas en phase de croissance *in vitro*.

carbonés sur la croissance des plants pendant la phase *in vitro* ; SENS (1988) ayant démontré l'intérêt de l'utilisation du fructose, cet élément a été introduit dans l'un des essais mis en place.

Par ailleurs, d'après la littérature citée, la croissance ralentie des vitroplants pourrait être liée à une fourniture insuffisante de glucides. L'effet d'un accroissement de la quantité de saccharose disponible par bananier a donc été également testé. Ce facteur a pu être contrôlé soit en augmentant la concentration de ce sucre dans la solution soit en réduisant le nombre de plants par boîte.

Matériel et méthodes

Les expérimentations ont été réalisées dans le laboratoire de physiologie du CIRAD-FLHOR⁽¹⁾ de Montpellier, en collaboration avec le laboratoire de culture *in vitro* du CIRAD. Les conditions de culture utilisées sont les suivantes : température $27\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, humidité relative jour/nuit 80 % / 90 %, lumière $40\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, 12 h/jour. Les plants utilisés ont été fournis par le laboratoire VITROPIC⁽²⁾. Ils sont issus de la micropropagation du cultivar Grande naine.

Un premier essai a permis de tester l'influence de la quantité et de la nature du sucre mis à la disposition du vitroplant. 1600 plants ont été installés dans des cellules de culture *in vitro*, selon le dispositif suivant :

- 1200 plants, utilisés comme référence, ont été répartis dans 12 boîtes (Sercobox de dimensions 15 cm x 15 cm x 15 cm) de 100 bananiers chacune, contenant 200 ml d'un milieu standard de croissance (MS) (MURASHIGE and SKOOG, 1962) ; l'analyse destructive de l'ensemble des plants prélevés dans 2 boîtes à chaque échantillonnage (tous les 4 jours) a permis de suivre la croissance végétative des bananiers par mesure des masses de matière fraîche et sèche ;

1. CIRAD-FLHOR : Département des productions fruitières et horticoles du CIRAD (ex IRFA : Institut de recherche sur les fruits et agrumes).

2. VITROPIC : Laboratoire de production de vitroplants de fruitiers tropicaux. Adresse : Zone d'activité économique des Avants, 34270 Saint-Mathieu-de-Trévières, France.

- 250 plants répartis dans 5 boîtes de 50 bananiers chacune et contenant le même milieu (MS) que précédemment ont permis de tester l'effet d'une augmentation de la quantité de sucre disponible par vitroplant et de limiter le phénomène de compétition entre eux ;

- 150 plants répartis en 3 boîtes de 50 bananiers chacune mais contenant le milieu de croissance (MS) modifié par la substitution de fructose (concentration de 40 g/l) au saccharose habituellement utilisé ont permis de comparer avec le traitement précédent l'effet de l'utilisation de ce sucre ; un échantillonnage est effectué tous les 8 jours.

Les observations réalisées portent sur les parties aériennes et souterraines qui sont pesées séparément avant d'être rassemblées pour mesurer la masse globale de matière sèche. Le pH et le volume du milieu de culture résiduel sont mesurés.

La dynamique de la consommation des glucides (saccharose et fructose), de l'azote sous ses différentes formes (ammoniacale et nitrique) et des principaux éléments minéraux est suivie durant la phase de croissance *in vitro*.

Un deuxième essai a permis d'étudier l'influence de la concentration en saccharose sur la croissance des plants : 6 boîtes contenant chacune une centaine de bananiers répartis en 25 touffes de 3 à 5 plants ont été utilisées. 2 milieux, aux concentrations respectives de 40 g/l et 80 g/l de saccharose, ont été réalisés.

Les conditions de culture sont identiques à celles du premier essai. Après 24 jours, les bananiers sont comptés, pesés et la composition des milieux restants est analysée.

Résultats et discussion

Croissance sur le milieu de culture standard

Masses de matière fraîche et sèche

Dès le quinzième jour, l'observation du ralentissement puis de l'arrêt total de la croissance des plants (figure 2) confirment les résultats déjà rapportés.

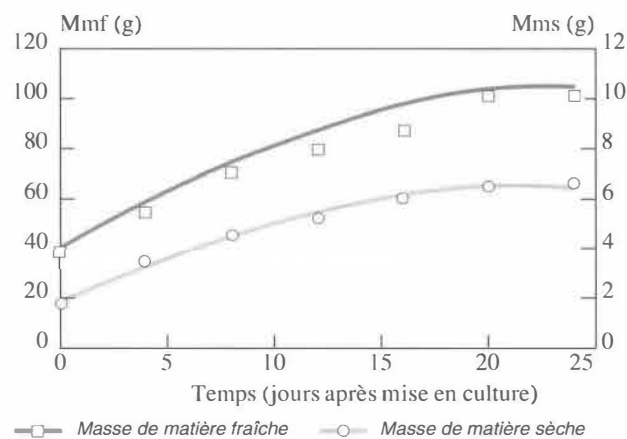


Figure 2. Evolution des masses de matière fraîche (Mmf) et sèche (Mms) de plants de bananiers pendant la phase de croissance *in vitro*. Conditions de culture : boîte Sercobox ; 200 ml de milieu par boîte ; saccharose 40 g/l ; 100 explants par boîte au jour J0.

Nutrition carbonée

La teneur du milieu en sucres totaux décroît tout au long de la phase de croissance *in vitro*. Le saccharose n'est plus présent dans le milieu 16 jours après le début de l'essai (figure 3) : il a pu être en partie absorbé par les plants et en partie hydrolysé en glucose et fructose qui ont été eux-mêmes consommés. L'acidification du milieu observée pendant le test contribue à cette hydrolyse. En fin d'essai, le milieu résiduel ne contient plus ni saccharose ni glucose, mais il reste une faible quantité de fructose (en moyenne 0,25 g/l). Les courbes (figure 3) montrent que la consommation nette de glucose et de fructose est consécutive à la disparition complète du saccharose dans le milieu de croissance.

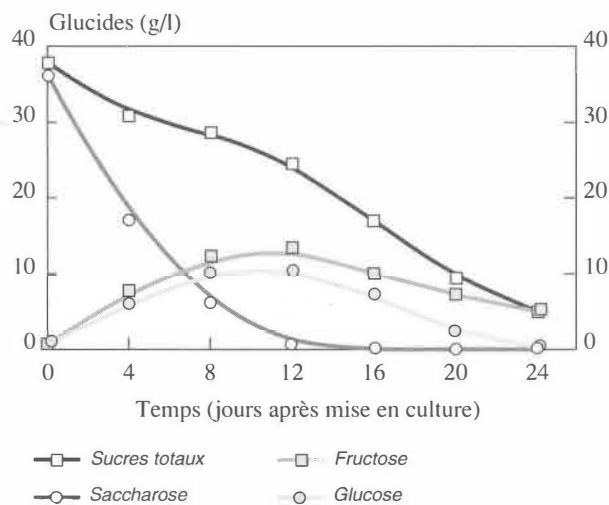


Figure 3. Evolution des concentrations des sucres présents dans le milieu de culture au cours de la phase de croissance.

L'augmentation de la matière sèche des 100 plants de bananiers placés en phase de croissance est en moyenne de 5 g (figure 2). Cela correspondrait à la fixation d'environ 2 g de carbone (le taux de carbone entrant dans la composition de la matière sèche est de 0,4 % d'après HELLER, 1977).

Or les 200 ml de solution à 40 g/l de saccharose apportée dans chaque boîte en début de culture contiennent 3,3 g de carbone ($C_{12}H_{22}O_{11} = 342$). En milieu contrôlé, les pertes de carbone sous forme de gaz carbonique dues à l'activité respiratoire de la plante sont estimées à 40 % du total fixé (cas des plantes entières *in vivo*, NAVARRO *et al.*, 1987). L'accumulation de 2 g de carbone par les plants, qui a été constatée au cours de cet essai, correspondrait donc à une consommation globale de 2,8 g de celui-ci. Cette quantité est pratiquement équivalente à celle présente dans la solution de départ : tout le saccharose apporté dans le milieu de culture au début de l'essai aurait été utilisé. En conséquence sa disponibilité pourrait être un facteur limitant de la croissance *in vitro* du bananier, la nutrition carbonée étant essentiellement hétérotrophique en boîte Sercobox.

Les courbes de la figure 4 confirment cette hypothèse : la quantité de carbone fournie à la plante sous forme de glucides apparaît insuffisante pour assurer sa croissance pendant toute la durée de la phase *in vitro*.

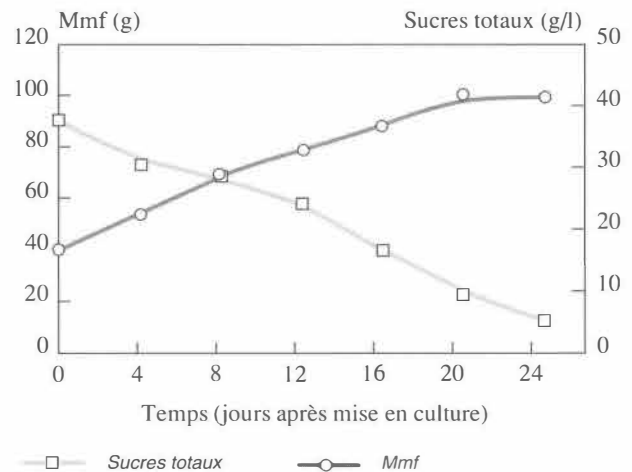


Figure 4. Evolution de la croissance des plants, mesurée par la masse de matière fraîche (Mmf), et de la concentration en sucres totaux dans le milieu pendant la phase de croissance.

Nutrition minérale

Au cours des 24 jours de culture la biomasse des plants a augmenté rapidement ; il s'en est suivi, par effet de dilution, une baisse progressive de leur teneur en éléments minéraux et plus particulièrement en azote (tableau 1). Après 15 jours de croissance ils ont entièrement consommé l'ammonium de la solution nutritive et il reste 10 % des nitrates. Le potassium, le phosphore, le calcium et le magnésium ont évolué différemment (figures 5 et 6) mais ont été également totalement absorbés par les bananiers à plus ou moins long terme. A l'issue la phase de croissance, la plante a donc absorbé tous les éléments disponibles, cependant aucun signe de carence n'a été observé sur les bananiers.

Croissance en conditions et sur milieu modifiés

Effet de la densité

La courbe de croissance correspondant à une densité de 50 bananiers par boîte est en forme de S (figure 7). Un ralentissement de l'évolution du développement des plants est observé vers le vingt-deuxième jour. L'analyse de la masse végétative alors présente révèle un gain de matière sèche de 16 % par rapport au test précédent réalisé avec une densité de 100 bananiers par boîte.

A la fin de l'essai, il reste 1,1 g de glucose et 1,6 g de fructose dans le milieu de culture ; le saccharose a entièrement disparu. Tous les éléments minéraux, excepté le calcium, ont été totalement consommés.

Effet de la nature du sucre

A la fin de la phase de croissance du lot de bananiers mis sur milieu (MS) avec remplacement du saccharose par du fructose, il reste 0,5 g de ce sucre dans le milieu ; 8 g (200 ml à 40 g/l dans chaque boîte) avaient été introduits au début de l'essai.

Le fructose comme le saccharose a donc été presque entièrement consommé par les plants, cependant la courbe de croissance est alors de type exponentielle (figure 8) : l'utilisa-

Tableau 1. Teneurs en éléments minéraux des parties aériennes des vitroplants de bananiers au cours de la phase de croissance (% de matière sèche).

Jours de prélèvements	N	P	K	Ca	Mg
J0	4,87	0,410	4,35	0,524	0,158
J4	4,39	0,511	4,82	0,413	0,160
J8	4,34	0,478	4,65	0,357	0,139
J12	4,26	0,411	4,27	0,366	0,134
J16	4,01	0,375	4,04	0,423	0,156
J20	3,80	0,369	3,74	0,510	0,152
J24	3,54	0,328	3,44	0,484	0,139

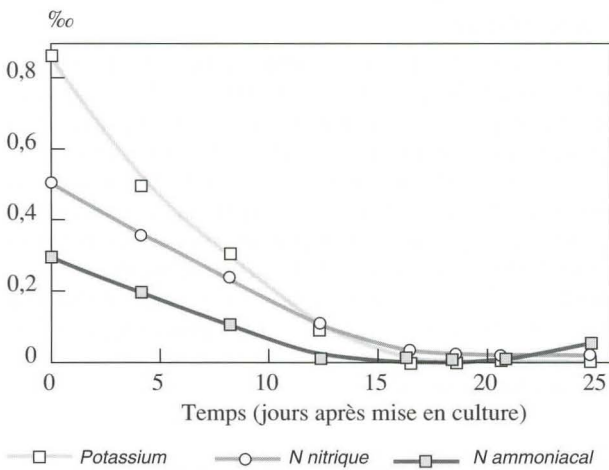


Figure 5. Evolution des concentrations en azote ammoniacal et nitrique, et potassium du milieu (MS) au cours de la phase de croissance.

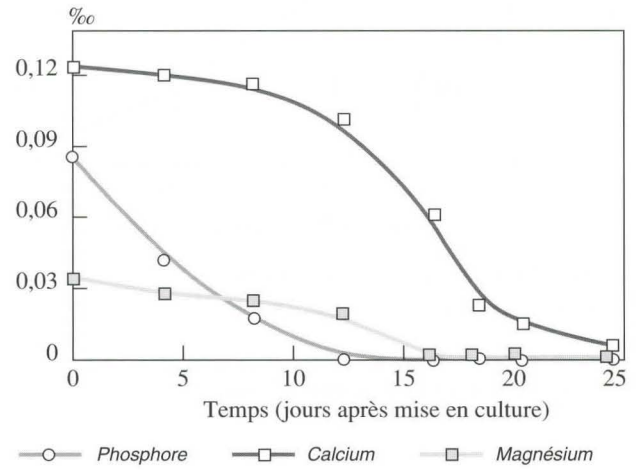


Figure 6. Evolution des concentrations en phosphore, calcium et magnésium du milieu (MS) au cours de la phase de croissance.

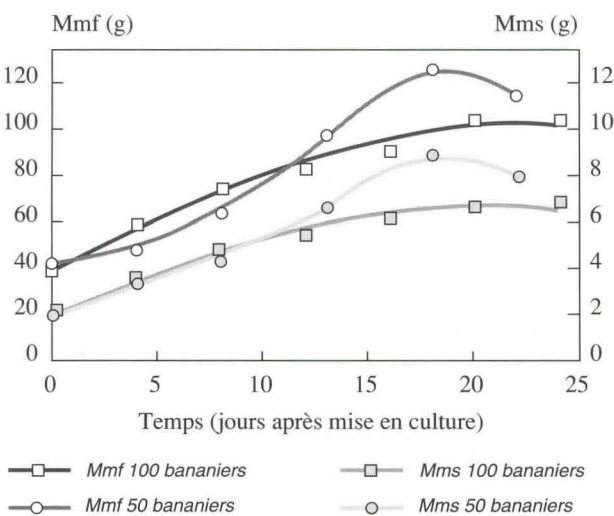


Figure 7. Evolution des masses de matière fraîche (Mmf) et sèche (Mms) des plants selon leur densité dans les conteneurs pendant la phase de croissance in vitro : 50 ou 100 plants par Sercobox.

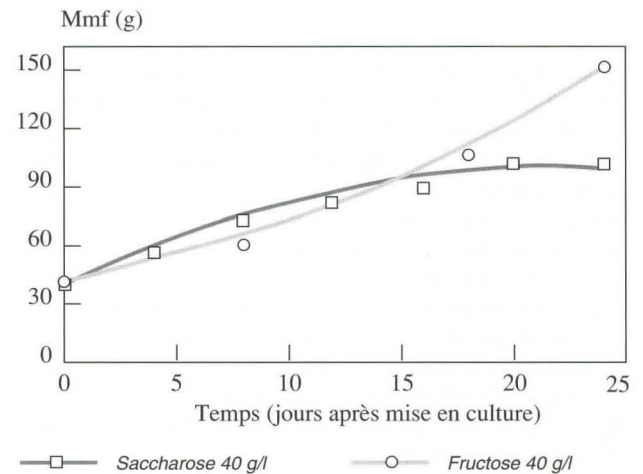


Figure 8. Influence sur la croissance des plants de bananiers, exprimée par leur masse de matière fraîche (Mmf), de la nature des sucres ajoutés au milieu de culture (saccharose ou fructose 40 g/l).

tion du fructose comme source carbonée permet un meilleur développement des bananiers que le saccharose. Ce résultat confirme ceux de SENS (1988) et MARCHAL *et al.* (1992). Le coût élevé de ce sucre limiterait pourtant son utilisation à l'échelle d'une production industrielle.

Effet de la concentration en saccharose

Les masses de matière fraîche des parties aériennes des plants de bananiers, obtenues après 24 jours de culture sur des milieux qui diffèrent par leur concentration en saccharose (respectivement 40 et 80 g/l), sont voisines (106 et 110 g). La masse de matière sèche, en revanche, varie : celle des plants qui ont été installés sur le milieu enrichi en saccharose est supérieure de 36 % à celle des plants sur milieu standard (tableau 2). Cela devrait leur conférer un avantage lors de la phase d'acclimatation qui va suivre.

La masse des racines correspondant au lot installé sur le milieu le plus concentré en saccharose a également augmenté (+ 76 %) : longueur et nombre des racines sont affectés.

Cependant au moment de l'installation ultérieure des plants en phase de sevrage *in vivo*, le système racinaire sera éliminé pour réduire les risques de contamination des plants par pourriture des racines. Les améliorations de masse observées ne pourront donc pas être exploitées par la plante.

A la fin de l'essai, seules quelques traces de saccharose subsistent dans les solutions résiduelles des deux traitements. Après 24 jours de culture il ne reste plus que 0,2 % des sucres présents initialement dans le milieu standard (40 g/l), et 1 % dans le milieu enrichi (80 g/l). Les éléments minéraux ont été entièrement consommés.

En fin de phase de croissance, les vitroplants issus des différents traitements peuvent être répartis selon différentes classes de poids (figure 9a et 9b).

Dans la pratique, en conditions standards de nutrition carbonée les plants peuvent être installés en phase d'acclimatation quand leur masse de matière fraîche atteint 0,75 g.

Tableau 2. Influence de la concentration en saccharose du milieu sur la croissance des plants de bananiers à l'issue de 24 jours de culture *in vitro*.

Concentration en saccharose	Masse de matière fraîche (g)		Masse matière sèche (g)	
	parties aériennes	parties racinaires	parties aériennes	parties racinaires
40 g/l	106,1	45,4 a	2,53 a	2,35 a
80 g/l	110,2	69,5 b	3,43 b	4,15 b
Test Newman et Keuls	NS	*	*	*

NS : test Newman et Keuls non significatif.
 * : test Newman et Keuls significatif au seuil de 5 %.
 a, b : identification des classes déterminées par le test de Newman et Keuls.

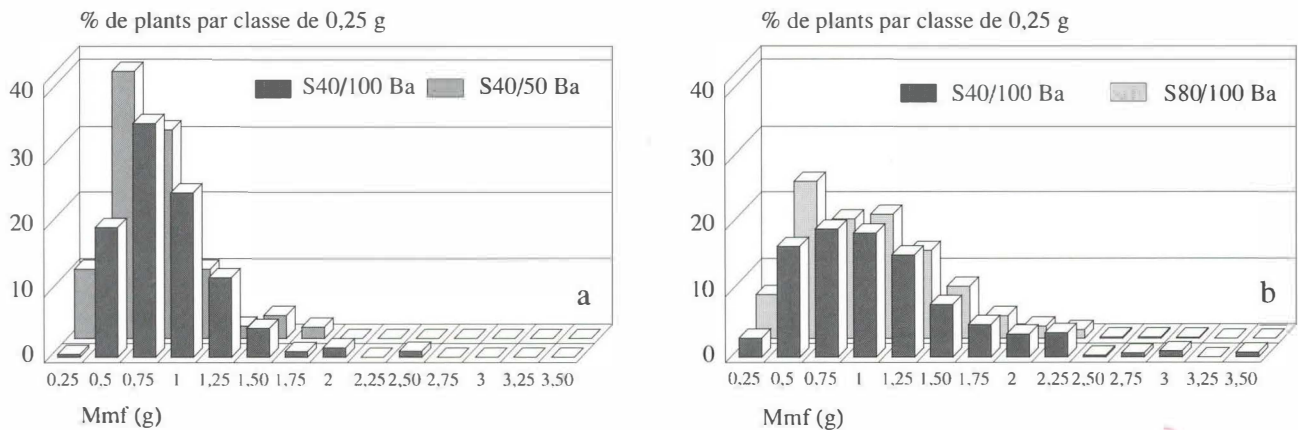


Figure 9. Répartition des plants en fonction de leur masse de matière fraîche (Mmf) à la fin de la phase de croissance in vitro.

a : à l'issue du 1^{er} essai qui teste la densité des plants (100 bananiers (100 Ba) et 50 bananiers (50 Ba) par boîtes).

b : à l'issue du 2^e essai qui teste 2 concentrations en saccharose (40 g/l (S40) et 80 g/l (S80)).

Mais après culture sur un milieu enrichi en sucre (figure 9b), des plants dont la matière fraîche varie de 0,5 g à 0,75 g pourront être sevrés, car leur teneur en matière sèche est alors plus élevée que celle obtenue sur milieu standard. Dans ce cas 93 % des plants sont utilisables alors que seulement 68 % d'entre eux le sont habituellement.

Sur 100 bananiers placés en phase de croissance en début d'expérimentation, 135 plants en moyenne sont obtenus à l'issue de 24 jours de culture sur le milieu enrichi en saccharose alors que seulement 100 d'entre eux sont récupérés sur le milieu standard (MS). Ces résultats ne sont probablement pas imputables à la reprise d'une prolifération pendant cette phase de croissance mais seraient plutôt le fait du développement de bourgeons déjà formés : DOMERGUE (1991) avait en effet constaté qu'un certain nombre de bourgeons constitués au cours de la phase de prolifération étaient potentiellement présents pendant la phase de croissance mais ne se développaient pas pour donner des plants. Seuls les bourgeons émettant des racines devenaient alors autonomes et produisaient des bananiers. Le milieu le plus riche en saccharose, stimulant fortement l'émission racinaire, aurait alors pour conséquence de favoriser le développement des bourgeons latents.

Conclusion

Ces travaux ont permis de suivre la consommation de certains éléments entrant dans la constitution du milieu de culture utilisé pour la croissance de vitroplants de bananiers. Ils ont conduit à vérifier et à préciser certaines connaissances qui seront prises en compte pour améliorer les conditions de multiplication accélérée de ce type de matériel végétal :

- la quantité de saccharose introduite au début de la phase de croissance dans le milieu de culture se révèle être en effet un des principaux facteurs limitant la croissance des plants ; la taille réduite des bananiers alors obtenus est un handicap pour la phase de sevrage *in vivo* dont elle limite le taux de réussite ; l'addition de saccharose en cours de vitroculture pourrait pallier ce manque et permettre une reprise de la croissance aboutissant à des plants de bonne vigueur ;

- les éléments minéraux présents dans le milieu de culture au début de l'essai ont été consommés en totalité par les plants en 20 jours ; ces derniers ne présentent aucune carence ; les analyses ont montré qu'ils possèdent des réserves importantes ; la composition minérale du milieu (MS) serait donc satisfaisante pour des plants de bananiers à ce stade de croissance ;

- une moindre densité des plants mis en culture leur permet d'exprimer au mieux leurs potentialités ; elle favorise une meilleure production végétale ;

- un milieu enrichi en saccharose, en augmentant la teneur en matière sèche des bananiers obtenus, permet d'accroître la proportion de plants sevrables et d'améliorer leur comportement au cours de la phase d'acclimatation ;

- l'amélioration du nombre de bananiers obtenus (+ 35 %) à l'issue de la phase de croissance sur un milieu plus concentré en saccharose que le milieu standard est à souligner pour l'exploitation qui pourrait en être faite dans le cadre d'une production industrielle ; il serait intéressant, en prolongement de ces premiers travaux, d'étudier par ailleurs l'influence d'un tel milieu enrichi en sucre sur le phénomène de bourgeonnement qui caractérise la phase de prolifération *in vitro*.

Dans le cas d'une culture intensive de vitroplants, la diminution du nombre de bananiers dans les boîtes et l'augmentation de la concentration en saccharose du milieu de culture concilieraient à la fois les impératifs économiques de production et l'obtention de plants de qualité. Compte tenu des résultats obtenus, une densité de 70 plants par boîte, mis en culture sur 200 ml d'un milieu standard (MS) enrichi avec 80 g/l de saccharose constituerait les meilleures conditions d'une croissance réussie.

Remerciements

Ces travaux ont été effectués avec la collaboration de Mmes Chantal JEANJEAN, Dolores NADIRAS et Monique BARDOT (unité de recherches et d'analyses du CIRAD-GERDAT) pour la réalisation des analyses minérales des plants de bananiers et des milieux de culture.

Références

DOMERGUE (R.). 1991.

Contribution à l'amélioration de la micropropagation du bananier plantain.

Montpellier, France : Université des sciences et techniques du Languedoc, mémoire de DES, 72 p.

HELLER (R.). 1977.

Physiologie végétale. Tome 1 : nutrition.

Paris : Masson éd, 244 p.

MARCHAL (J.), SENS (I.) et TEISSON (C.). 1992.

Influence des sucres et des facteurs bioclimatiques sur la culture in vitro du bananier.

Fruits, 47 (1), 17-24.

MURASHIGE (T.) and SKOOG (F.). 1962.

A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.

Physiol. Plant, 47, 207-214.

NAVARRO-MASTACHE (L.C.), TEISSON (C.), GANRY (J.) et

SCHOCH (P.G.). 1987.

Incidence des facteurs de croissance in vitro sur le transfert des plants de bananiers cv. Petite naine.

In: DUCATE (G.), JACOB (M.) et SIMEON (A.) , eds. *Symposium Florizel, Arlon, Belgique*. 282-285.

NAVARRO-MASTACHE (L.C.). 1990.

Effet de l'intensité lumineuse, de l'aération et de l'enrichissement en CO₂ au cours de la micropropagation du bananier (Musa acuminata cv. Petite naine) sur le développement des plants in vitro et en phase d'acclimatation in vivo.

Toulouse : Institut National Polytechnique, Thèse, 137 p.

SENS (I.). 1988.

Approche sur la nutrition minérale et hydrocarbonée des bananiers en culture in vitro.

Montpellier, France : Université des sciences et techniques du Languedoc, DEA, 47 p.

TEISSON (C.). 1987.

Quelques résultats sur la culture in vitro du bananier et du plantain dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique.

Santa Marta, Colombie : congrès ACORBAT 21-25 sept. 1987.

Crecimiento *in vitro* de los bananeros (cv. Grande naine) : estudio del consumo de la fuente en carbono y de los principales elementos minerales del medio de cultivo.

M. FOLLIOY y J. MARCHAL

Fruits, vol. 47, n°5, p. 565-571.

RESUMEN - Diferentes formas de glucidos (sacarosa y fructosa) así como dos concentraciones en sacarosa (40 y 80 g/l) son probadas sobre bananeros en fase de crecimiento *in vitro*. También se estudió el efecto de la densidad de las plantas en las cajas de cultivo.

Los resultados demuestran un efecto positivo sobre el crecimiento de bananeros de una cantidad mayor de sacarosa a la disposición de las plantas. Se demostró también que el uso de la fructosa como fuente de carbono es favorable al crecimiento.

PALABRAS CLAVES : *Musa acuminata*, micropropagacion, cultivo *in vitro*, carbono, azucars, crecimiento, substrato de cultivo, nutricion de las plantas
