

Régénération directe *in vitro* de l'*Ananas comosus* (L.) Merrill var. Cayenne à partir de couronnes cultivées en milieu liquide

Ndoumou Denis Omokolo, Fotso*, Margaret Awah Tita, Nicolas Niemenak

Université de Yaoundé I,
École normale supérieure,
Laboratoire de Physiologie
végétale, LAF314,
BP 47, Yaoundé,
Cameroun

niemenak@uycdc.uninet.cm

Direct *in vitro* regeneration of *Ananas comosus* (L.) Merrill var. Cayenne from crowns cultivated in a liquid medium.

Abstract — Introduction. The majority of work on the *in vitro* multiplication of pineapple has used explants of various origins, but far fewer has used crowns for obtaining *in vitro* plantlets. In addition, the plant regeneration carried out through the formation of calli can induce somaclonal variations. So an *in vitro* method of direct regeneration from the crowns was tested. **Materials and methods.** After disinfection, pineapple crowns of the Cayenne variety were cultivated on a liquid medium of Murashige and Skoog half-diluted, added to (2 to 10) mg BAP \times L⁻¹ or (2 to 12) mg kinetin \times L⁻¹. The induction of the axillary buds was observed after 14 d of culture and the number of developed plantlets was counted after 65 d. Certain seedlings were then acclimatized on a soil and vermiculite mixture before being transferred to the field. **Results and discussion.** The best rates of plantlet induction and development were obtained with 4 mg BAP \times L⁻¹ (on average 6.7 plantlets per crown in 65 d) and 6 mg kinetin \times L⁻¹ (11.9 plantlets per crown). The plantlets acclimatized and transferred to the field survived 100%. **Conclusion.** The direct development of a significant number of axillary buds thanks to the use of cytokinins constitutes an intermediate technique between horticulture practices and *in vitro* culture. However, to test the performances of the plants resulting from the plantlets thus regenerated, their productivity will have to be evaluated, compared to that of the plantlets obtained in a traditional way.

Cameroun / *Ananas comosus* / *in vitro* regeneration / micropropagation

Régénération directe *in vitro* de l'*Ananas comosus* (L.) Merrill var. Cayenne à partir de couronnes cultivées en milieu liquide.

Résumé — Introduction. La plupart des travaux sur la multiplication *in vitro* de l'ananas ont utilisé des explants de diverses origines, mais peu font état de l'utilisation de couronnes pour l'obtention de plantules *in vitro*. Par ailleurs, la régénération de plants effectuée *via* la formation de cals est susceptible d'induire des variations somaclonales. De ce fait, une méthode de régénération directe *in vitro* à partir des couronnes a été testée. **Matériel et méthodes.** Après désinfection, des couronnes d'ananas de la variété cayenne ont été cultivées sur un milieu liquide de Murashige et Skoog dilué de moitié, contenant (2 à 10) mg BAP \times L⁻¹ ou (2 à 12) mg kinétine \times L⁻¹. L'induction des bourgeons axillaires a été observée après 14 j de culture et le nombre de plantules développées a été compté après 65 j. Certaines plantules ont alors été acclimatées sur un mélange de terre et vermiculite avant d'être transférées au champ. **Résultats et discussion.** Les meilleurs taux d'induction et de développement de plantules ont été obtenus avec 4 mg BAP \times L⁻¹ (en moyenne 6,7 plantules par couronne en 65 j) et 6 mg kinétine \times L⁻¹ (11,9 plantules par couronne). Les plantules acclimatées et transférées au champ ont survécu à 100 %. **Conclusion.** Le démarrage direct d'un nombre important de bourgeons axillaires de couronne grâce à l'utilisation d'une cytokinine constitue une technique intermédiaire entre les pratiques d'horticulture et la culture *in vitro*. Toutefois, la productivité des plants issus des plantules ainsi régénérées devra être évaluée comparativement à celle des plants obtenus de façon traditionnelle afin d'en tester les performances.

* Correspondance et tirés à part

Fruits, 2001, vol. 56, p. 415–421
© 2001 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved

RESUMEN ESPAÑOL, p. 421

Cameroun / *Ananas comosus* / régénération *in vitro* / micropropagation

1. Introduction

Le genre *Ananas*, de la famille des broméliacées, comporte plusieurs espèces. Cependant, toutes les variétés ou cultivars actuellement exploités pour leur fruit à des fins de consommation en frais et d'industries agroalimentaire ou pharmaceutique appartiennent à une seule d'entre elles : *A. comosus*. Au Cameroun, la production d'ananas d'exportation a connu une hausse de 97 % au cours des deux dernières années. Elle est passée de 5 236 t en 1998/1999 à 10 310,7 t en 1999/2000 [1]. À l'échelle mondiale, les importations d'ananas frais devraient augmenter de 35 %, soit atteindre 922×10^3 t, d'ici 2005 [2].

Les auto-incompatibilités génétiques notées chez la plupart des cultivars d'ananas et les plantations menées en cultures monovariétales favorisent la production de fruits parthénocarpiques sans semences [3]. L'ananas est multiplié végétativement. Traditionnellement, la propagation se fait soit à partir des rejets prélevés sur les plantes en champ lors de la production de fruits frais, soit à partir des couronnes prélevées sur des ananas mûrs dans le cas de fruits destinés à la conserverie. Dans ce dernier cas, chaque couronne évolue généralement en une seule plante qui donnera un seul fruit.

La multiplication *in vitro* est une technique de multiplication qui permet de disposer rapidement de matériel de plantation de bonne qualité sanitaire. Ces deux qualités sont recherchées dans le cadre de la multiplication rapide de nouvelles variétés sélectionnées et du renouvellement des plantations.

Les premiers travaux sur la propagation *in vitro* de l'ananas datent de 1960 [4]. Depuis lors, plusieurs types d'explants différents ont été testés : apex [5–7], nodules [8], bourgeons latéraux [9] et syncarpes [10]. À l'issue de ces travaux, certaines variations somaclonales sont apparues [11, 12], qui peuvent présenter des caractéristiques avantageuses. Cependant, pour une propagation en masse, la multiplication conforme du génotype reste indispensable.

L'objectif de nos travaux a été de développer une méthode de régénération *in vitro* conforme de plants d'ananas. Des expérimentations visant la régénération directe de vitroplants à partir des couronnes, en vue de la multiplication rapide d'un génotype sélectionné, ont été mises en place.

2. Matériel et méthodes

La base de couronnes d'*A. comosus* var. cayenne, prélevées sur des fruits mûrs récoltés dans une plantation de la région de Bafia (Cameroun), a été complètement débarrassée de ses feuilles (*figure 1*). Ce matériel a alors été lavé à l'eau courante pendant 2 h, puis aseptisé par trempages successifs de 1 h dans une solution de mercryl laurylé à 15 % et 45 min dans une solution d'hypochlorite de sodium 30 %. Ces trempages ont été suivis de trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile, de 15 min chacun. Cette méthode a permis d'obtenir un taux d'environ 92 % de couronnes désinfectées.

Le milieu de base adopté pour les différentes cultures a été une solution minérale de Murashige et Skoog [13] diluée de moitié et additionnée de 2 % de saccharose et de vitamines de Morel. Pour l'induction et la croissance des bourgeons axillaires, ce

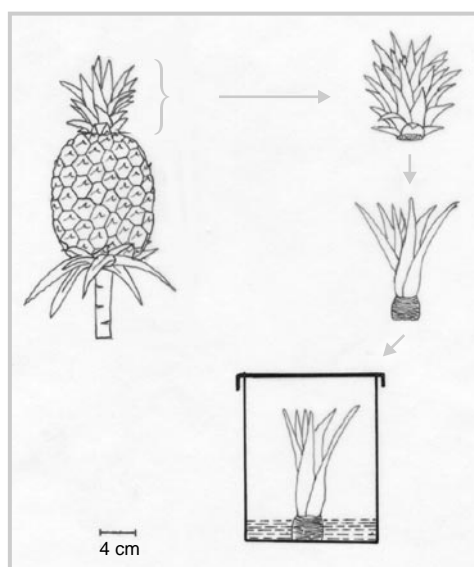


Figure 1. Protocole d'isolement et de mise en culture de couronnes d'ananas : après prélèvement sur un fruit mûr, la couronne est débarrassée de ses feuilles basales puis désinfectée avant d'être transférée dans un milieu de culture liquide.

Tableau I.

Nombre moyen de bourgeons axillaires induits et développés en plantules par couronne d'*Ananas comosus*. Explants cultivés dans un milieu liquide de Murashige et Skoog dilué de moitié et additionné de saccharose (2 %), vitamines de Morel et cytokinines (BAP ou kinétine) à différentes concentrations (40 couronnes utilisées par dose de phytohormones BAP ou kinétine).

Phytohormones (mg × L ⁻¹)	Nombre moyen de bourgeons apparus par couronne	Nombre moyen de plantules obtenues par couronne
BAP		
0	2,2 e	0
2	5,6 c	0
4	17,4 a	6,7 a
6	7,7 b	2,3 b
8	4,1 d	1,8 c
10	4,1 d	0
Kinétine		
0	2,2 d	0
2	2,8 c	0
4	6,6 b	2,7 b
6	21,7 a	11,9 a
8	6,4 b	2,6 b
10	3,2 c	1,5 c
12	2,2 d	0

Pour chaque phytohormone, les valeurs de chaque colonne ayant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes d'après le test de Duncan ($p \leq 0,05$).

milieu de base liquide a été enrichi par l'ajout de phytohormones à différentes concentrations : soit (0, 2, 4, 6, 8 et 10) mg benzylaminopurine (BAP) × L⁻¹, soit (0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12) mg kinétine × L⁻¹ (tableau I). Le pH des différents milieux a été ajusté à 5,6.

Les milieux liquides testés ont été distribués dans des flacons en verre de 15 cm de hauteur et 12 cm de diamètre, puis stérilisés par autoclavage à 115 °C pendant 30 min, sous une pression de 1,6 kg × cm⁻².

Les couronnes aseptisées, légèrement incisées à la base, ont alors été placées dans ces flacons, à raison d'une couronne par flacon (figure 1), sous une hotte à flux laminaire horizontal et au voisinage de la flamme d'un bec Bunsen. Les flacons ont été entreposés dans une salle à (26 ± 1) °C avec un éclairage de 40 μmol × m⁻² × s⁻¹ pendant 16 h par jour.

Quarante couronnes ont été mises en culture dans chacun des milieux constitués du milieu de base enrichi d'une phytohormone donnée, à une concentration déterminée. Pour chacune de ces couronnes, le nombre de bourgeons apparus a été dénombré après 14 j de culture dans ces milieux ; puis le nombre de bourgeons développés en plantules, compté par couronne et par milieu, a été évalué après 65 j. Les résultats ont été traités par analyse de variance et les moyennes significativement différentes séparées par le test de Duncan ($p \leq 5 \%$).

Le développement des bourgeons en plantules a été évalué par le comptage, tous les 10 j, du nombre moyen de feuilles formées sur chaque bourgeon induit. Au bout de 65 j, 200 plantules, à raison de 100 plantules développées sur BAP et 100 plantules sur kinétine, isolées des couronnes et comportant chacune de 1 à 4 racines, ont été



Figure 2. Présence de bourgeons sur couronnes d'ananas après 14 j de culture dans un milieu liquide de Musrashige et Skoog dilué de moitié et additionné de saccharose (2 %), vitamines de Morel et cytokinines (BAP ou kinétine).



Figure 3. Plantules régénérées sur couronne d'ananas, 65 j après mise en culture sur un milieu de base additionné de 4 mg BAP \times L⁻¹.

Tableau II.

Évolution au cours du temps du nombre de feuilles développées par plantules issues de bourgeons prélevés sur couronnes et cultivés dans un milieu liquide de Musrashige et Skoog dilué de moitié et additionné de saccharose (2 %), vitamines de Morel et cytokinines (BAP ou kinétine) à différentes concentrations.

Temps (j)	Nombre moyen de feuilles par plantule									
	BAP (mg \times L ⁻¹)					Kinétine (mg \times L ⁻¹)				
	0	4	6	8	0	4	6	8	10	
0–30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
30–40	–	4,8 d	3,3 d	3,2 d	–	2,1 c	2,1 d	3,2 c	2,1 d	
40–50	–	7,8 c	6,4 c	5,7 c	–	2,1 c	3,2 c	4,2 b	3,1 c	
50–60	–	9,9 b	8,3 b	9,2 b	–	3,2 b	4,2 b	4,4 b	4,2 b	
60–70	–	12,1 a	10,2 a	10,2 a	–	5,6 a	7,3 a	5,6 a	5,5 a	

Pour chaque phytohormone, les valeurs de chaque colonne ayant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes d'après le test de Duncan ($p \leq 0,05$).

repiquées, pour acclimatation, en sachets en polyéthylène perforés de 18 cm de hauteur et 12 cm de diamètre, remplis d'un mélange de terre et de vermiculite (v/v). Les plantules acclimatées ont été transférées en champ 35 j après ce repiquage.

3. Résultats

3.1. Induction des bourgeons axillaires

Après 14 j de culture sur les milieux de base enrichis soit en BAP, soit en kinétine, de nombreux bourgeons axillaires ont pu être observés sur les couronnes (*figure 2*). Leur développement a été influencé de manière significative par la nature et la concentration de la phytohormone utilisée.

Avec la BAP, 17,8 bourgeons par couronne ont été obtenus au maximum et cela avec le milieu à 4 mg \times L⁻¹. Avec la kinétine, 21,7 bourgeons par couronne ont été obtenus au maximum, avec le milieu à 6 mg \times L⁻¹ (*tableau I*).

3.2. Développement des bourgeons en plantules

Comme dans le cas de l'induction des bourgeons, le nombre moyen de bourgeons développés en plantules a varié en fonction de la nature et de la concentration de la phytohormone présente dans le milieu de culture. Avec la BAP, 65 j après mise en culture, il a été possible d'obtenir au maximum un nombre de 6,7 plantules par couronne et cela sur le milieu à 4 mg BAP \times L⁻¹ (*tableau I, figure 3*). Ces plantules, vert foncé, présentaient chacune, en moyenne, 10,2 à 12,1 feuilles (*tableau II*). Dans les mêmes délais, avec la kinétine, le nombre maximal de plantules développées a été de 11,9 sur un milieu à 6 mg kinétine \times L⁻¹, (*tableau I, figure 4*). Elles étaient alors d'un vert jaunâtre et présentaient un nombre moyen de feuilles compris entre 5,6 et 7,3 (*tableau II*).

Quel que soit le milieu de culture utilisé, Les plantules détachées des couronnes (*figure 5*) ont eu un taux d'acclimatation de 100 % (*figure 6*). Lors de leur transfert en champ, après une phase de 35 j d'acclimatation, elles ont toutes survécu (*figure 7*).

4. Discussion

La méthode traditionnelle de multiplication végétative de l'ananas est limitée du fait d'un faible nombre de rejets (0 à 3) produits par plante en champ, ou de couronne (1) portée par le fruit. Les techniques de culture *in vitro* utilisées actuellement pour la propagation rapide de cette plante permettent la production d'un grand nombre de plantules et leur assainissement [14, 15]. Cependant, comme chez la plupart des espèces, ces techniques qui utilisent les explants de différentes origines nécessitent le plus souvent, avant régénération des plantules, un passage du matériel végétal par le stade de cal [16–19]. Outre le type d'explant, la régénération *in vitro* de l'ananas est influencée par d'autres facteurs, notamment la composition du milieu de culture [20, 21] et, surtout, la nature et la concentration des phytohormones utilisées [22] qui déterminent la durée de culture et le nombre de plantules potentiellement régénérées.

Les travaux présentés ont confirmé la plupart de ces résultats déjà publiés. Cependant, ils ont permis de régénérer des plantules directement sur couronnes cultivées en milieu liquide, sans passer par le stade de cal. De ce fait, la technique que nous avons utilisée n'induit pas la formation d'embryons somatiques issus de tels cals puis différenciés en plantules [23] qui peuvent présenter des variations somaclonales, avantageuses ou non selon les objectifs visés [24, 25].

Une méthode de régénération directe *in vitro* de plantules d'ananas avait déjà été testée par Kiss *et al.* [26]. À partir de fragments d'entre-nœuds prélevés sur les plantules étiolées, cultivés sur milieu MS solide additionné d'acide naphthalène acétique (ANA) à 10 μM , les auteurs avaient obtenu des taux de multiplication comparables à ceux obtenus lors de nos travaux.

La méthode de régénération directe *in vitro* de l'ananas à partir des couronnes telle que nous l'avons mise au point est intéressante car elle permet la multiplication conforme du génotype de la plante mère ; les plantules régénérées sont saines ; le

nombre de plantules régénérées par couronne en 65 j, de 6,7 ou 11,9 selon la phytohormone et la concentration utilisées, est nettement supérieur aux taux de multiplication généralement obtenu par multiplication traditionnelle.



Figure 4. Plantules régénérées sur couronne d'ananas, 65 j après mise en culture sur un milieu de base additionné de 6 mg kinétine \times L⁻¹.

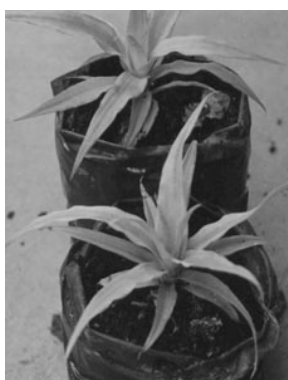


Figure 6. Plantules d'ananas acclimatées, 35 j après leur repiquage sur un substrat de terre et vermiculite (v/v), aptes à être transférées en champ.



Figure 5. Plantules d'ananas munies de racines, détachées des couronnes d'ananas 65 j après mise en culture sur un milieu de base additionné d'une cytokinine et aptes à être transférées en phase d'acclimatation.



Figure 7. Jeunes plants d'ananas issus de la régénération directe de bourgeons axillaires de couronnes cultivées *in vitro*, 30 j après leur transfert en champ.

5. Conclusion

La méthode de régénération directe d'*Ananas comosus* var. cayenne mise au point à partir de couronnes cultivées dans un milieu MS liquide dilué de moitié, en présence de 4 mg BAP \times L⁻¹ ou de 6 mg kinétine \times L⁻¹, a permis d'obtenir environ 6 ou 12 plantules par couronne, selon les cas, en 2 mois. Cela permet d'envisager une production de plus d'une cinquantaine de plants par couronne et par an, à la condition de faire un choix judicieux de la phytohormone utilisée et de sa concentration. Les plantules ainsi régénérées se sont toutes acclimatées et ont survécu après leur transfert en champ.

Le démarrage direct d'un nombre important de bourgeons axillaires grâce à l'utilisation d'une cytokinine constitue une technique intermédiaire entre les pratiques d'horticulture et la culture *in vitro*. Toutefois, la productivité des plants issus des plantules ainsi régénérées devra être évaluée comparativement à celle des plants obtenus de façon traditionnelle afin d'en tester les performances.

Références

- [1] Anonyme, Annuaire des statistiques du secteur agricole 1999/2000, FAO, Agri-Stat 6 (2000) 50–51.
- [2] Anonyme, Perspectives à moyen terme des produits agricoles. Projections à l'horizon 2005, FAO, Rome, Italie, 2000, pp. 129–130.
- [3] Brewbaker J., Gorrez D., Genetics of cell, in: Monocot genera *Ananas* (pineapple) and *Gastericia*, Amer. J. Bot. 54 (5) (1967) 611–616.
- [4] Aghion D., Beauchesne G., Utilisation de la technique de culture stérile d'organes pour obtenir des clones d'ananas, Fruits 15 (1962) 464–466.
- [5] Fichet M., Tissue culture of pineapple, Information Bulletin, Citrus Subtrop. Fruit Res. Instit. 149 (1985) 1–2.
- [6] Mapes M.O., Tissue culture of bromeliads, Comb. Proc. Int. Plant Propagators' Soc. 3 (1973) 47–55.
- [7] Mathews V.H., Rangan T.S., Maranyanaswamy S., Micropropagation of *Ananas sativus* *in vitro*, Z. Pflanzenphysiol. 79 (5) (1976) 450–454.
- [8] Teng W.L., An alternative propagation method of ananas through nodule culture, Plant Cell Rep. 16 (7) (1997) 454–457.
- [9] Zepada C., Sagawa Y., *In vitro* propagation of pineapple, HortScience 16 (4) (1981) 495.
- [10] Wakasa K., Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple, Jpn. J. Breeding 29 (1) (1979) 13–22.
- [11] Skirvin R.M., Fruit crops, in: Conger B.V. (Ed), Cloning agricultural plants *via in vitro* techniques, Chem. Rubber Co. Press, Boca Raton, Fla., USA, 1981, pp. 51–139.
- [12] Larkin P.J., Scowcroft W.R., Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, Theor. Appl. Genet. 60 (4) (1981) 197–214.
- [13] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, Physiol. Plant. 15 (1962) 473–497.
- [14] Drew R.A., Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication, Qld. Agric. J. 106 (5) (1980) 447–451.
- [15] Wee Y.C., Mass propagation of pineapple planting materials, Singap. J. Prim. Ind. 7 (1) (1979) 24–26.
- [16] Rao N.K.S., Swamy R.D., Chacko E.K., Differentiation of plantlets in hybrid embryo callus of pineapple, Sci. Hortic. 15 (3) (1981) 235–238.
- [17] Sudhadevi P.K., Geetha C.K., Rajeevam P.K., Performance of *in vitro* developed pineapple plantlets of cv. Kew, South Indian Hortic. 43 (5/6) (1995) 166–167.
- [18] Mathews V.H., Rangan T.S., Growth and regeneration of plantlets in callus culture of pineapple, Sci. Hortic. 14 (3) (1981) 227–234.
- [19] Hsia ChiNi, Korban S.S., Organogenesis and somatic embryogenesis in callus culture of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44 (1) (1996) 1–6.
- [20] Hirimburegama K., Wijeshinghe L.P.J., *In vitro* growth of *Ananas comosus* L. Merr (pineapple shoot apices) on different media, in: Hayashi M., Kano A., Goto E. (Eds.), Acta Hortic. 319 (1992) 203–208.
- [21] Mayak S., Tirosh T., Ilan A., Duvdevani A., Khayat E., Growth and development of pineapple (*Ananas comosus* (L.) plantlets cultured *in vitro* at enriched and ambient CO₂ environments, in: Drew R.A. (Ed.), Acta Hortic. 461 (1998) 225–229.

- [22] Almeida W.A.B. de, Matos A.P. de, Souza A. da, Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.), in: Martin-Prével P., Hugon R. (Eds.), Acta Hortic. 425 (1997) 235–242.
- [23] Wakasa K., Koga Y., Kudo M., Differentiation from *in vitro* culture of *Ananas comosus*, Jpn. J. Breeding 28 (1978) 113–121.
- [24] DeWald M.G., Moore G.A., Sherman W.B., Evans M.H., Production of pineapple plants *in vitro*, Plant Cell Rep. 7 (7) (1988) 535–537.
- [25] Loison-Cabot C., État des connaissances botaniques, cytogénétiques et biologiques sur la reproduction de l'ananas, Fruits 45 (4) (1990) 347–355.
- [26] Kiss E., Kiss J., Gyulai G., Heszky L.E., A novel method for rapid micropropagation of pineapple, Sci. Hortic. 30 (1) (1995) 127–129.

Regeneración directa *in vitro* del *Ananas comosus* (L.) Merrill var. Cayenne a partir de coronas cultivadas en medio líquido.

Resumen — Introducción. En la mayoría de los trabajos sobre la multiplicación *in vitro* de la piña se utilizaron explantes de diferentes orígenes, pero son escasos aquellos que emplearon coronas para la obtención de plántulas *in vitro*. Por otro lado, la regeneración de plantas efectuada mediante la formación de callos puede inducir variaciones somaclonales. Por ello, se ha probado un método de regeneración directa *in vitro* a partir de coronas. **Material y métodos.** Tras desinfección, se cultivaron coronas de piña de la variedad Cayenne en un medio líquido Murashige y Skoog diluido a la mitad con (2 a 10) mg BAP \times L⁻¹ o (2 a 12) mg kinetina \times L⁻¹. Se observó la inducción de yemas axilares tras 14 d de cultivo y se contó el número de plántulas desarrolladas tras 65 d. Algunas plántulas fueron entonces aclimatadas en un medio de tierra y vermiculita antes de su traslado al campo. **Resultados y discusión.** Las mejores tasas de inducción y desarrollo de plántulas se obtuvieron con 4 mg BAP \times L⁻¹ (promedio de 6,7 plántulas por corona en 65 d) y 6 mg kinetina \times L⁻¹ (11,9 plántulas por corona). El 100% de las plántulas aclimatadas y trasladadas al campo sobrevivieron. **Conclusión.** El brote directo de un número importante de yemas axilares gracias a la utilización de una citoquinina constituye una técnica intermedia entre las prácticas de horticultura y el cultivo *in vitro*. Sin embargo, se tendrá que evaluar la productividad de las plantas procedentes de plántulas regeneradas de esta forma comparándola con las plantas obtenidas de manera tradicional para valorar su desempeño.

Camerún / *Ananas comosus* / regeneración *in vitro* / micropropagación

To access this journal online:
www.edpsciences.org
