

## **Influence de la composition du milieu et des conditions de culture sur la prolifération *in vitro* de l'hybride de bananier FHIA- 01 (AAAB)**

### **[ Influence of the substratum composition and culture conditions on the *in vitro* proliferation of banana hybrid FHIA-01 (AAAB) ]**

**Mazinga Kwey Michel<sup>1</sup>, Mario Godoy Jara<sup>2</sup>, Julien Louvieux<sup>2</sup>, Baboy Longanza Louis<sup>3-4</sup>, Useni Sikuzani Yannick<sup>3</sup>, Nyembo Kimuni Luciens<sup>3</sup>, Ngoie Kalenga Gédéon<sup>5</sup>, Tshitungu Bilitu Eddie<sup>6</sup>, Kasongo Lenge Emery<sup>3</sup>, Stefaan Werbrouck<sup>7</sup>, and Van Koninckxloo Michel<sup>8</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire de culture in vitro des plantes, Département de Phytotechnie, Faculté des Sciences Agronomiques, Université de Lubumbashi B.P 1825 Lubumbashi, Democratic Republic of the Congo

<sup>2</sup>Haute Ecole Provinciale du Hainaut Occidentale-Condorcet et laboratoire de culture in vitro du centre de Recherches «Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la Province de Hainaut» (CARAH asbl), rue Paul Pastur 11, 7800 ATH, Belgium

<sup>3</sup>Département de phytotechnie, Faculté des Sciences Agronomiques, Université de Lubumbashi B.P 1825 Lubumbashi, Democratic Republic of the Congo

<sup>4</sup>Collaborateur Scientifique au Service d'Écologie du Paysage et Systèmes de Production Végétale, Université Libre de Bruxelles, Avenue F.D. Roosevelt 50, CP 169 B-1050 Bruxelles, Belgium

<sup>5</sup>Département de phytotechnie, Faculté des sciences agronomiques, Université de Kamina, Kamina, Democratic Republic of the Congo

<sup>6</sup>Ecole Supérieure des Ingénieurs Industriels, Université de Lubumbashi B.P 1825 Lubumbashi, Democratic Republic of the Congo

<sup>7</sup>Faculty of Biosciences and Landscape Architecture, Campus Schoonmeersen, Voskenslan 270. BE-9000, Ghent Hogeschool Gent, Member of Ghent University Association, Belgium

<sup>8</sup>Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la Province de Hainaut (CARAH asbl) et Inspection générale de l'enseignement supérieur de la Province de Hainaut, rue Paul Pasteur 11, 7800 ATH, Belgium

---

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** Two essays were carried out to evaluate the effect of different types of auxins on root formation and the influence of dark and culture substratum on tetraploid hybrid FHIA-01 proliferation (Musa spp. AAAB). The plant material consisted of tissue culture plantlets of FHIA -01 hybrid tetraploid banana (Musa AAAB). The trial, with a total of 10 replicates per treatment was carried out in each pot containing five explants. For both tests, a combination of two cytokinins was enriched in culture substratum. The results obtained show that regeneration was high in culture substratum with light than substratum without meta-methoxytopolin riboside (M2). The medium M2 to the light induced a higher number of the buds compared to medium dose reduced meta-methoxytopolin riboside (M1). Meanwhile, only explants inoculated on the medium M1 in the dark induced callus. The bud proliferation, induction of root, leaf and the broadcast callus induction are significantly influenced by the different substratum and photoperiod, increasing the explant size, the number of emerged leaves, roots and the number of the weight of explant with buds proliferated. Formulating specific culture media cultivars

according to group (ABB or AAA) and the choice of culture conditions (light intensity) would avoid consecutive failures and low proliferation in *in vitro* culture.

**KEYWORDS:** Banana, *in vitro* culture, plant hormones, photoperiod, banana explants, micropropagation.

**RESUME:** Deux essais ont été mis en place en vue d'évaluer d'une part les effets de différents types d'auxines sur la rhizogénèse et de l'autre l'influence de l'obscurité et du milieu de culture sur la prolifération de l'hybride tétraploïde FHIA-01 (*Musa* spp. AAAB). Le matériel végétal était constitué des vitroplants de FHIA-01, hybride tétraploïde du bananier (*Musa* AAAB). L'essai, avec un total de 10 répétitions par traitement, a été réalisé en pot contenant chacun 5 explants. Pour les deux essais, une combinaison de deux cytokinines a été enrichie au milieu de culture. Les résultats obtenus montrent que pour le milieu de culture, la régénération des bourgeons a été supérieure à la lumière comparativement au milieu sans meta-methoxytopoline riboside (M2). Le milieu M2 à la lumière a induit un nombre de bourgeons supérieur comparativement au milieu à dose réduite de meta-methoxytopoline riboside (M1). Parallèlement, seuls les explants inoculés sur le milieu M1 à l'obscurité, ont induit les cals. La prolifération de bourgeons, l'induction de racines, l'émission foliaire et l'induction de cals sont nettement influencées par les différents milieux et photopériode, en augmentant la taille d'explant, le nombre de feuilles émises, le nombre de racines et le poids d'explant avec les bourgeons proliférés. La formulation des milieux de culture spécifiques aux cultivars selon le groupe (ABB ou AAA, etc.) et le choix des conditions de culture (intensité lumineuse) éviteraient des échecs consécutifs et les faibles proliférations lors de la culture *in vitro*.

**MOTS-CLEFS:** Bananier, culture *in vitro*, phytohormones, photopériodes, bananier, explants, micropropagation.

## 1 INTRODUCTION

Les phytohormones, peuvent parfois inhiber l'induction racinaire ou induire un système racinaire de mauvaise qualité, chez une espèce ou cultivar et faire le contraire chez un autre. Par ailleurs, la plupart des plantes montrent une régénération génotypique spécifique liée à l'espèce. A l'intérieur d'une même espèce, un génotype donne des bourgeons tandis qu'un autre ne peut fournir que des embryons [1]. De même, les concentrations de 10  $\mu$ M à 20  $\mu$ M BAP ont produit suffisamment de racines chez FHIA-01 [2]. Les résultats de l'étude sur l'effet de l'ajout des cytokinines BAP (10  $\mu$ M) + MemTR (10  $\mu$ M) sur la prolifération de l'hybride FHIA-01 ont montré une amélioration de la prolifération de bourgeons tout en inhibant l'enracinement [3]. La culture *in vitro* chez les Musacées est utilisée comme une méthode alternative à la propagation traditionnelle [4]. Depuis 30 décennies maintenant, la propagation du bananier à partir de culture de tissu a connu un essor, à cause de l'aptitude de cette technique à produire du matériel génétiquement uniforme et sain [5]; [6]; [7]; [8]. Mais également, la culture de tissus joue un rôle essentiel dans la distribution du matériel génétique, conservation, échange sécuritaires de matériel de plantation et la distribution rapide des variétés hybrides nouvellement sélectionnées [9]. Néanmoins, quelques cas d'instabilités génétiques ont été rencontrés chez les plantes régénérées à partir de cals, à la suite de subcultures répétées, de culture de protoplastes ou de suspensions cellulaires [10] ; [11]; [12]; [8]. Il s'avère que l'organogénèse directe à partir de méristèmes apicaux serait indiquée pour assurer une prolifération destinée à la production commerciale de vitroplants de bananier et de bananier plantain [8]. En effet, cette voie permet d'obtenir des plantes saines, indemnes de maladies et génétiquement plus stables [13]. Les vitroplants des bananiers obtenus à partir de culture de tissus ont un cycle précoce et un rendement élevé par rapport à ceux issus de la multiplication naturelle [14]; [8].

Beaucoup d'auteurs ont réalisé plusieurs travaux sur la multiplication du bananier à partir d'apex [15]. La stimulation de la multiplication des pousses par la variation du type et de la concentration des régulateurs de croissance et des sources de carbone, ont été rapportées par [16] ; [17] ; [18]; [19]; [20] ; [21]. [22] et [23] ont effectué des incisions sur l'apex de *Musa* afin de stimuler la production en masse de pousses. Par ailleurs, [8] ont évalué l'influence de la formulation vitaminique sur la micropropagation de bananier plantain. D'autres auteurs ont adapté divers types de bioréacteurs ou des systèmes d'immersion temporaire pour augmenter les taux de multiplication des vitroplants de bananiers [24]; [25]; [26].

D'autres encore ont évalué les effets des dérivés de l'Urée diphenyle pour propager des cultivars [27]; [28]; [29]; [30]. Mais il n'y a pas eu beaucoup de publications sur l'impact de la photopériode et celle de [8] n'a évalué que l'influence de la photopériode sur les potentialités de la micropropagation du bananier plantain. Or, la culture en l'obscurité permettra d'économiser les coûts d'éclairage et de conditionnement de la salle de culture. La multiplication végétative des hybrides tolérants ou résistants offrirait également un moyen de lutte efficace contre certaines maladies qui constituent une menace

réelle pour la culture bananière en RD Congo et certaines régions du globe. Pour contourner ce problème, une étude a été réalisée avec deux essais dans la perspective d'évaluer l'influence de l'obscurité, de la lumière et du milieu de culture sur la prolifération de l'hybride tétraploïde FHIA-01 (*Musa spp.* AAAB).

## 2 MATERIELS ET METHODES

Dans cette étude, le matériel végétal utilisé dans les deux essais était constitué des vitroplants de FHIA-01, hybride tétraploïde du bananier (*Musa* AAAB) dont l'étape d'initiation a été réalisée au laboratoire de l'INIBAP à K.U. Leuven en Belgique, indexés pour les virus [17]. Les essais ont été réalisés au laboratoire de Biotechnologie de HogeSchool Gent et au laboratoire de Culture *in vitro* du CARAH à l'HEPH-Condorcet d'Ath en Belgique. Pour les deux essais, une combinaison de deux cytokinines, 10 µM de BAP et 10 µM de MemTR, a été enrichie au milieu de culture. Dans le premier essai réalisé sur l'effet des différentes auxines, les cultures ont été placées sous la température de 27 ± 2°C, et une photopériode de 16 h pendant 45 jours. Le milieu de culture MS [31] a été utilisé. Les traitements contenaient 1 µM de différentes auxines soit 1µM de AIA, NAA ou IBA, sauf le contrôle qui n'a pas été enrichi en auxine.

Pour évaluer l'influence de la photopériode sur la prolifération des cals, trois milieux de culture (M1, M2, M3) ont été élaborés (Tableau 1). Chaque milieu M1, M2 ou M3, a été testé à l'obscurité totale et à la lumière sous une intensité lumineuse continue de 50 µE.m<sup>-2</sup>.S<sup>-1</sup> tel que recommandé par [12]. L'ensemble de l'essai a été placé dans la chambre de culture Binder à 27°C, pour évaluer la prolifération de FHIA-01. Dans les deux essais, les racines ainsi que les feuilles des explants initiaux ont été enlevées et les explants ont été coupés à 0,5 cm au-dessus du méristème apical. La vérification des bactéries à croissance lente était réalisée selon la méthode décrite par [32]. Bien que n'intervenant généralement pas dans la multiplication *in vitro* des pousses, les bactéries peuvent être problématiques dans les stades ultérieurs [12]. Pour les deux essais, un total de 10 répétitions par traitement a été réalisé et 100 ml de milieu de culture par pot en raison de 5 explants inoculés. Au bout de 45 jours, les observations ont été réalisées sur les paramètres suivant : le nombre de cals induits, de bourgeons, de feuilles, de racines et la taille de l'explant initial.

**Tableau 1. Composition de différents milieux de culture**

Composition	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
Eau UP (ml)	1000	1000	1000
MS MS macro, micro + vitamines (Duchefa) (g)	4,405	4,405	4,405
Acide ascorbique (mg)	10	10	10
BAP (µM)	10	10	20
MemTR (µM)	10	-	20
AIA (mg)	0,175	0,175	0,175
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (µl)	50	100	150
Sucrose	40	40	40
Gelrite pH 5.8	3	3	3

Les observations ont porté sur les paramètres de croissance et de développement (nombre de bourgeons, le nombre de feuilles, la taille de vitroplants, l'induction racinaire et le poids des explants et le nombre de cals) et les données obtenues ont été soumises à une analyse de la variance (ANOVA), à l'aide du logiciel SPSS. En cas de différences significatives, la comparaison des moyennes était réalisée par le test de Newman-Keuls au seuil 5 %. Des corrélations (Corrélation de Pearson) ont été également réalisées entre les paramètres étudiés.

## 3 RESULTATS

### 3.1 EFFETS DES AUXINES IAA, IBA ET NAA SUR LA PROLIFERATION DE L'HYBRIDE FHIA-01 (AAAB) DU BANANIER EN CULTURE *IN VITRO*

La Figure 1 présente l'évolution du nombre de bourgeons induits après 45 jours de prolifération de l'hybride FHIA-01 du bananier en culture *in vitro*. La comparaison de différentes auxines par rapport au nombre de bourgeons formés pendant la phase de prolifération a montré des différences significatives (p=0,03). Il a été constaté que l'ajout de l'acide indole acétique dans le milieu MS [31] a induit le nombre de bourgeons supérieur comparativement aux deux autres auxines (IBA et NAA). Les

valeurs moyennes étaient respectivement de  $4,7 \pm 3,3$  (a);  $2,2 \pm 1,6$  (b);  $2 \pm 2,1$  (b) et  $3,1 \pm 1,4$  (ab) pour AIA, AIB, NAA et contrôle.

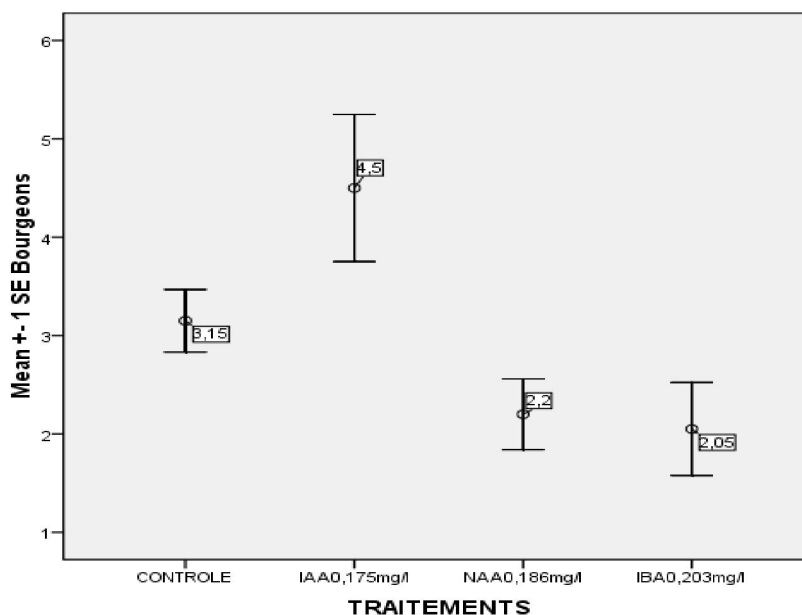


Fig. 1. Effets des auxines IAA, IBA ET NAA, sur le nombre de bourgeons proliférés

Une différence significative a été constatée entre les différentes auxines en ce qui concerne l'émission foliaire ( $p < 0,05$ ). Il ressort de cet essai que l'ajout de l'acide naphthalène acétique dans les milieux MS [31] était favorable à l'émission foliaire que les autres auxines (IBA et IAA). Les valeurs moyennes étaient respectivement de  $4,9 \pm 1,4$  (a);  $3,6 \pm 1,8$  (ab);  $2,5 \pm 2$  (b) et  $4,4 \pm 0,9$  (a) pour NAA, AIB, AIA et le contrôle (figure 2).

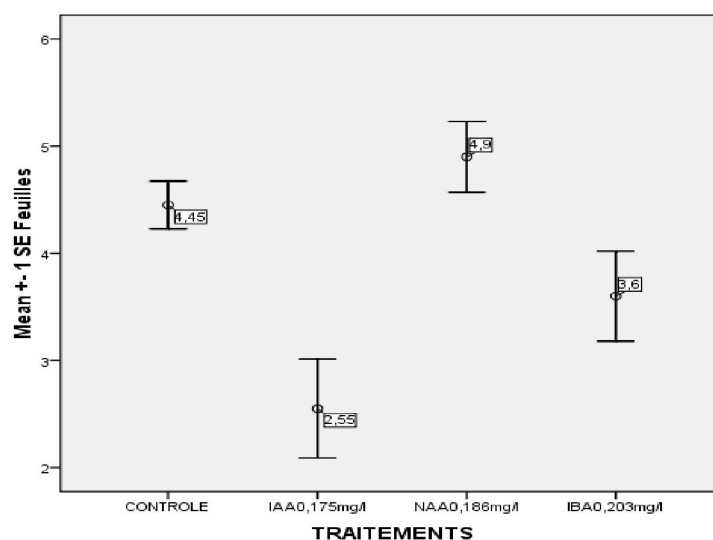


Fig. 2. Effets des auxines IAA, IBA ET NAA, sur le nombre de feuilles

La Figure 3 présente l'évolution de l'induction racinaire après 45 jours dans le milieu de prolifération. Une différence significative était constatée entre les différentes auxines en ce qui concerne l'induction racinaire ( $p = 0,030$ ). Il ressort de cet essai que l'ajout de l'acide naphthalène acétique dans les milieux MS [31] était favorable à l'induction racinaire que les autres

auxines (IAA). Les valeurs moyennes étaient respectivement de  $4,8 \pm 1,3(a)$  ;  $4,2 \pm 3(ab)$  ;  $2,8 \pm 2(b)$  et  $4,9 \pm 2,5(a)$  pour NAA, AIB, AIA et contrôle. Les corrélations entre les différents paramètres sont reprises dans le tableau 2.

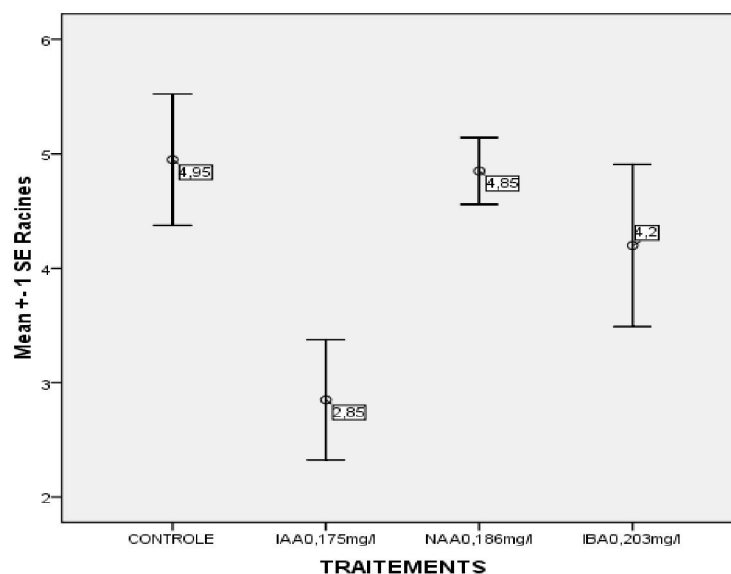


Fig. 3. Effets des auxines IAA, IBA ET NAA, sur l'induction racinaire

Il ressort du tableau 2 que la taille d'explant, nombre de feuilles émises, nombre de racines et le poids d'explants révèlent des corrélations négativement significatives avec les bourgeons qui prolifèrent. Par contre, les autres paramètres ont montré des corrélations positives significatives.

Tableau 2. Corrélations des différents paramètres de croissance et de développement

		Bourgeons	Feuilles	Taille	Racines	Poids
<b>Bourgeons</b>	Corrélation de Pearson	1	<b>-,663</b>	<b>-,273</b>	<b>-,585</b>	<b>-,557</b>
	Sig. (bilatérale)		,000	,014	,000	,000
	N	80	80	80	80	80
<b>Feuilles</b>	Corrélation de Pearson	<b>-,663</b>	1	,445**	,714**	,474**
	Sig. (bilatérale)	,000		,000	,000	,000
	N	80	80	80	80	80
<b>Taille</b>	Corrélation de Pearson	<b>-,273</b>	,445**	1	,367**	,328**
	Sig. (bilatérale)	<b>,014</b>	,000		,001	,003
	N	80	80	80	80	80
<b>Racines</b>	Corrélation de Pearson	<b>-,585</b>	,714**	,367**	1	,444**
	Sig. (bilatérale)	,000	,000	,001		,000
	N	80	80	80	80	80
<b>Poids</b>	Corrélation de Pearson	<b>-,557</b>	,474**	,328**	,444**	1
	Sig. (bilatérale)	,000	,000	,003	,000	
	N	80	80	80	80	80

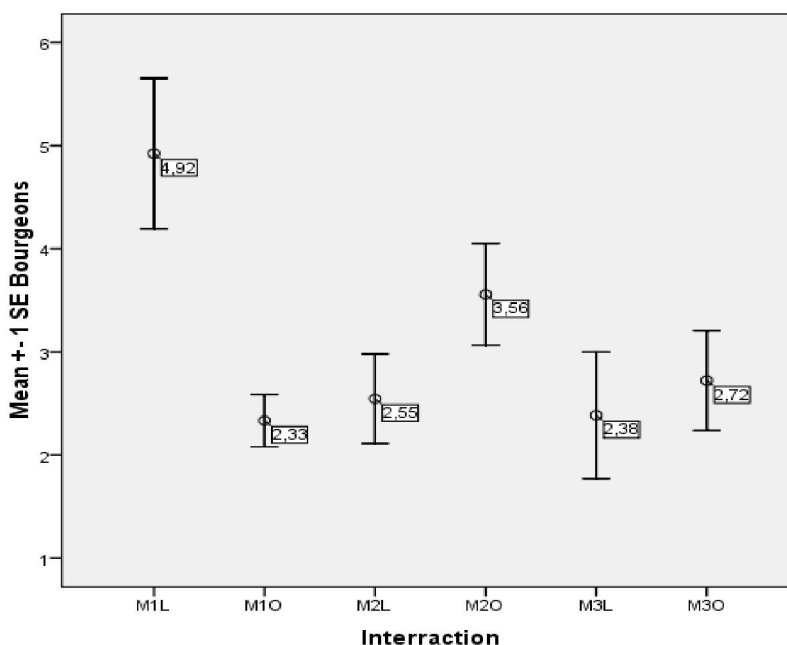
\*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

\*\*.. La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

### 3.2 EFFETS DE LA PHOTOPERIODE ET DES MILIEUX DE CULTURE SUR LA PROLIFERATION FHIA-01

L'analyse statistique n'a pas révélé des différences significatives de régénération des bourgeons en fonction des milieux et des conditions de culture considérées séparément ( $p > 0,05$ ).

Cependant une différence significative était observée en terme d'interaction entre les deux facteurs étudiés ( $p = 0,009$ ). Il a été constaté que la combinaison de M1 et lumière ainsi que M2 et obscurité avaient induit plus de bourgeons comparativement aux autres. Les valeurs moyennes d'interaction étaient de  $4,9 \pm 2,6$  (a);  $3,5 \pm 2$  (ab);  $2,3 \pm 0,8$  (b);  $2,5 \pm 1,4$  (b);  $2,3 \pm 2,2$  (b);  $2,2 \pm 2$  (b) (Figure 4).



**Fig. 4.** Influence simultanée de F1 M1 sur le nombre de bourgeons. M1L = Milieu 1 à la lumière, M1O = milieu 2 à l'obscurité, M2L = milieu 2 à la lumière, M2O = milieu 2 à l'obscurité, M3L = milieu 3 à la lumière, M3O = milieu 3 à l'obscurité

Une différence significative a été observée entre les vitroplants dans les trois milieux de culture ; alors que la lumière accroît l'émission foliaire chez le vitroplants ( $p < 0,05$ ). Les valeurs moyennes pour les milieux étaient respectivement de  $0,15 \pm 0,65$  (c),  $1,02 \pm 1,1$  (b),  $2,1 \pm 1,05$  (a). La présence de la lumière avait présenté une moyenne de  $1,33 \pm 1,2$  (a) et l'obscurité  $0,85 \pm 0,15$  (b) (Figure 5).

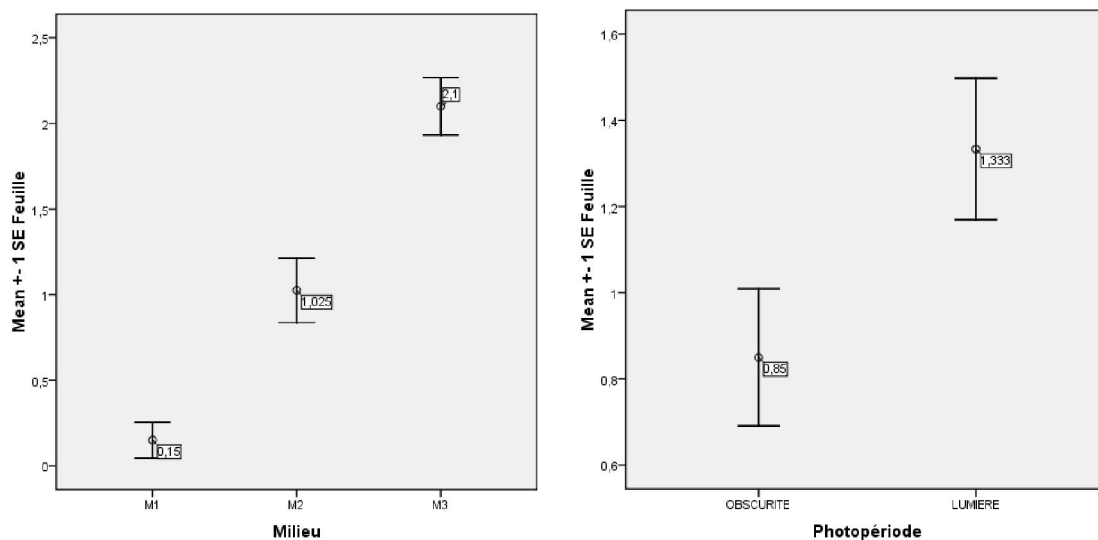


Fig. 5. Influence séparée de milieu et la photopériode sur l'émission foliaire

Une différence significative était observée en termes d'interaction entre les deux facteurs étudiés ( $p < 0,05$ ). Il a été constaté que la combinaison de M3 dans les deux conditions et M2 à l'obscurité avait induit plus de feuilles comparativement aux autres. Les valeurs moyennes d'interaction étaient de 0 (b);  $0,3 \pm 0,9$  (b);  $0,2 \pm 0,6$  (b);  $1,8 \pm 1,1$ (a);  $2,3 \pm 0,9$  (a);  $1,9 \pm 1,1$  (a) respectivement pour M1L, M1O, M2L, M2O, M3L et M3O (Figure 6).

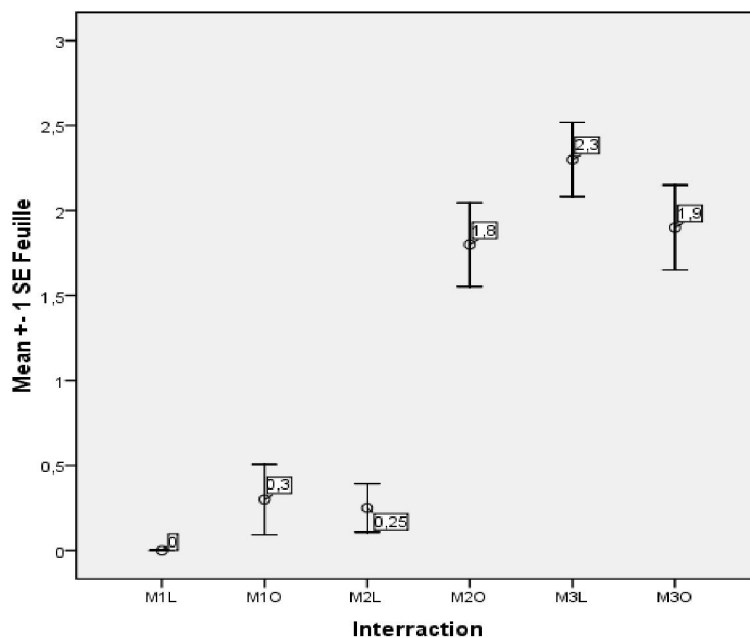


Fig. 6. Influence simultanée de milieu et de la photopériode sur les bourgeons

L'analyse statistique n'a pas révélé des différences d'induction racinaire en fonction des milieux et des conditions de culture considérés séparément ( $p > 0,05$ ). En revanche, une différence significative a été observée en termes d'interaction entre les deux facteurs étudiés ( $p < 0,05$ ). Il a été constaté que la combinaison de M1 et l'obscurité ainsi que M2 et lumière avait induit plus de racines comparativement aux autres. Les valeurs moyennes d'interaction étaient de  $0,3 \pm 0,9$  (b);  $1,5 \pm 1,5$  (a);  $1,6 \pm 1,8$  (a);  $0,3 \pm 0,8$  (b);  $0,3 \pm 0,5$  (b);  $0,7 \pm 1,3$  (ab) (Figure 7).

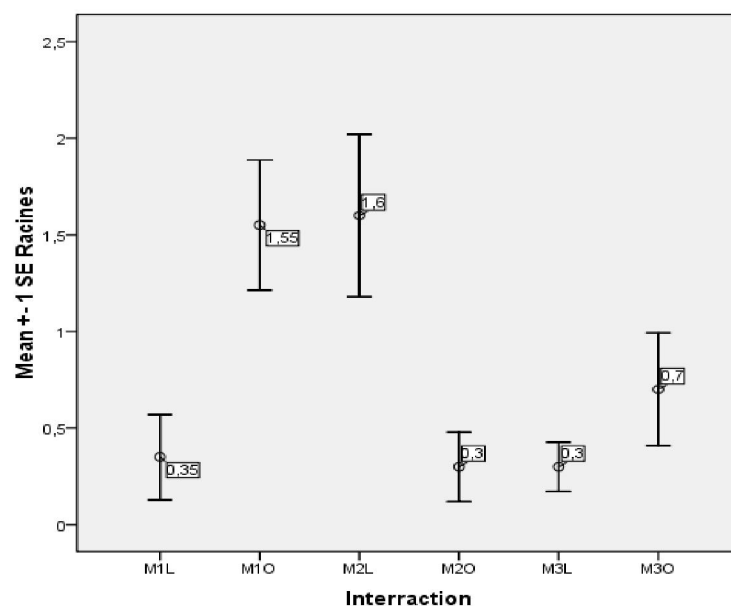


Fig. 7. Influence simultanée de milieu et de la photopériode sur l'induction racinaire

Les résultats sur l'induction de la calogénèse montrent que seul le milieu M1 a donné une réponse positive, avec une moyenne de  $0,75 \pm 0,42$ . Par ailleurs, en termes d'interactions, seul le milieu M1 avait induit les cals soit  $1,5 \pm 0,8$ . Par ailleurs, il ressort du tableau 3 qui démontre des corrélations négatives nettement significatives entre la taille d'explant, nombre de feuilles émises, nombre de racines, le poids d'explant avec les bourgeons proliférés. Par ailleurs, les corrélations positives significatives entre les autres paramètres ont été enregistrées à l'exception du nombre de bourgeons.



Tableau 3. Corrélations des paramètres de croissance et de développement en réponse aux milieux de culture et à la photopériode

		Bourgeon	Racines	taille	Feuille	Cals
<b>Bourgeon</b>	Corrélation de Pearson	1	-,214*	-,060	-,131	,170
	Sig. (bilatérale)		,049	,587	,232	,119
	N	85	85	85	85	85
<b>Racines</b>	Corrélation de Pearson	-,214*	1	,533**	-,082	-,095
	Sig. (bilatérale)	,049		,000	,372	,301
	N	85	120	120	120	120
<b>Taille</b>	Corrélation de Pearson	-,060	,533**	1	-,022	-,102
	Sig. (bilatérale)	,587	,000		,810	,268
	N	85	120	120	120	120
<b>Feuille</b>	Corrélation de Pearson	-,131	-,082	-,022	1	-,138
	Sig. (bilatérale)	,232	,372	,810		,132
	N	85	120	120	120	120
<b>Cals</b>	Corrélation de Pearson	,170	-,095	-,102	-,138	1
	Sig. (bilatérale)	,119	,301	,268	,132	
	N	85	120	120	120	120

\*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

\*\* . La corrélation est significative au niveau

En analyse multivariée (analyse discriminante), il a été constaté que la prolifération de bourgeons, l'induction de racines, l'émission foliaire et l'induction de cals étaient significativement influencées par les différents milieux et photopériode avant classement (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats de l'analyse multivariée avant classement des effets des milieux et de la photopériode sur la rhizogénèse

Paramètres	Traitements						Valeurs de p
	M1L	M1O	M2L	M2O	M3L	M3O	
Bourgeons	4,9±2,6	2,3±0,8	2,5±1,4	3,5±2	2,3±2,2	2,7±2	<0,05
Racines	0±0	1,3±1,5	1,5±1,8	0,2±0,7	0,2±0,5	0,7±1,3	<0,05
Taille	1,9±1	2,3±1,3	1,7±1	1,8±0,7	0,9±0,7	2,7±0,5	<0,615
Feuilles	0±0	0,08±0,02	0,2±0,6	1,8±1,1	2±1	1,9±1,1	<0,05
Cals	2,3±4,3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	<0,05
Classement (%)	40	55	40	35	55	20	

De l'analyse multivariée (analyse discriminante), il a été constaté que, après classement, tous les paramètres (prolifération de bourgeons, induction de racines, émission foliaire, induction de cals et taille d'explant) sont devenus significatifs avec des moyennes appropriées à chaque traitement (Tableau 5).

Tableau 5. Résultats de l'analyse multivariée après classement des effets des milieux et de la photopériode sur la rhizogénèse

Paramètres	Traitements						Valeurs de p
	M1L	M1O	M2L	M2O	M3L	M3O	
Bourgeons	6,6±2	0,3±1	2,5±1	5,1±2,1	1,8±0,7	2,5±2	<0,05
Racines	0, ±0	0,6±1,2	1,5±1,7	0±0	0,4±0,2	2,6±0,8	<0,05
Taille	1,8±0,9	2,4±1,3	1,4±0,6	1,8±0,5	2±0,5	2,6±0,7	<0,05
Feuilles	0±0	0,05±0,02	0,2±0,5	1,9±0,9	2,2±0,6	3±0,8	<0,05
Cals	3±4,2	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	<0,05
Classement (%)	80	94	63	50	100	72	

Le pourcentage de « bien classé » avant classement était de : 40%, 55%, 40%, 35%, et 20%. Après amélioration du classement le pourcentage est passé à 80%, 94, 63% 50% 100% et 72%. Illustrant une séparation nette entre les barycentres de chaque traitement (Figure 8).

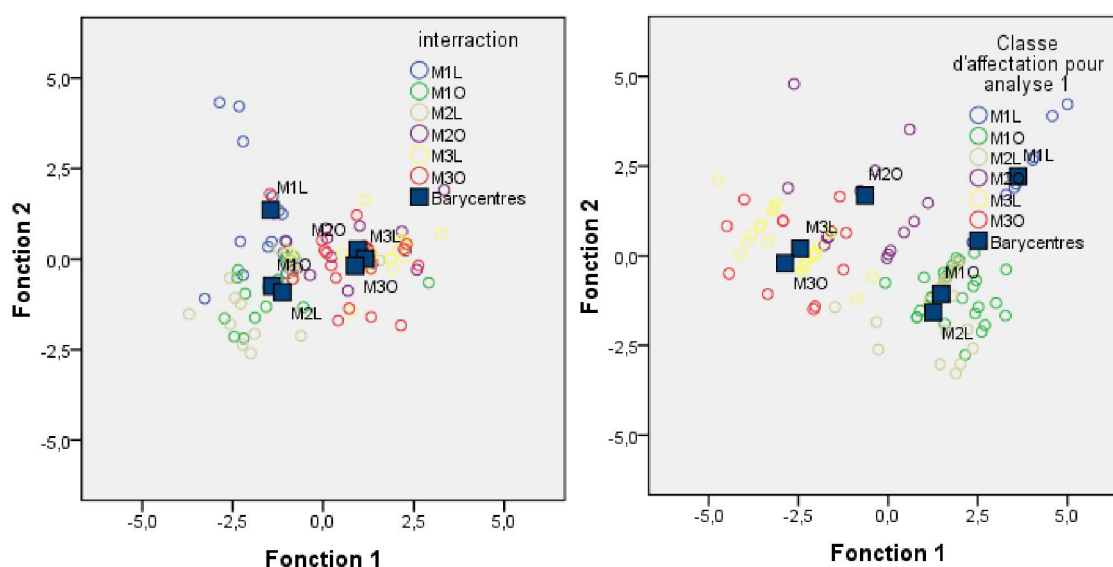


Fig. 8. Fonctions discriminantes canoniques de l'évolution moyenne de croissance et de développement des vitroplants de bananier sous différents milieux de culture et photopériode

#### 4 DISCUSSIONS

L'analyse statistique a révélé une différence de régénération des bourgeons en fonction des conditions de culture (obscurité ou lumière) et du milieu de culture. Pour le milieu de culture (M1), la régénération des bourgeons obtenue de l'hybride FHIA-01 a été supérieure à la lumière comparativement au milieu M2. La production efficiente des pousses *in vitro* a fait l'objet de nombreuses études chez les monocotylédones et les dicotylédones [33] ; [34] ; [35]. Tous les systèmes de régénération semblent avoir en commun une première période de prolifération des méristèmes axillaires qui est caractérisé par un taux relativement faible de multiplication des pousses [8]. Cette situation peut également être attribuée à la faible capacité de prolifération du matériel végétal utilisé (FHIA-01, AAAB). Par ailleurs, cette situation peut changer pour les cultivars à fort potentiel de prolifération, la plupart appartenant au groupe ABB [36].

Le milieu M2 à la lumière a induit un nombre de bourgeons supérieur comparativement au milieu M1. Les mêmes résultats ont été obtenus par [8], qui ont enregistré une forte induction de bourgeons axillaires à la photopériode 12 heures. La régénération des bourgeons dépend non seulement des formulations vitaminiques auxquelles les explants sont soumis, mais aussi de la photopériode [8]. La différence du nombre de bourgeons obtenu avec le milieu M2 comparativement au milieu M1, peut s'expliquer par la différence de sa composition en phytohormone et de la concentration des phytohormones du milieu. La stimulation de la multiplication des pousses est souvent fonction de la variation du type de phytohormones, de la concentration des phytohormones et des sources de carbone [37].

Le milieu M2 à l'obscurité a induit un nombre des racines statistiquement supérieur comparativement à M1 et M3. [8] ont enregistré un taux d'enracinement élevé sur les milieux enrichis avec les vitamines MS et placés 2 semaines à l'obscurité avant de subir une photopériode de 12 heures ; mais ils n'ont pas atteint 80 % du taux d'enracinement. L'apparition des racines est plus rapide à l'obscurité qu'à la lumière. L'auxine endogène produit par la plante pourrait être plus active lorsque les plantules séjournent à l'obscurité [8]. En effet, l'obscurité permet une meilleure qualité de l'enracinement [38]. Les explants ont présenté à leur base des touffes de petites pousses et de plantules enracinées sans formation de méristèmes à la base de l'explant. Ceci est la caractéristique des cultivars à potentiel de prolifération faible [11].

Dans cet essai, l'induction des cals a été faible et seuls les explants inoculés sur le milieu M1 à l'obscurité, ont induit les cals. L'obscurité limite l'oxydation des composés phénoliques et optimise l'expression des phytohormones. Ceci impliquerait que l'obscurité réduirait la dominance apicale de la pousse primaire et favoriserait par conséquent la prolifération du tissu méristématique [8]. Les bourgeons axillaires ont été observés à la base de l'explant initial au détriment des bourgeons adventifs. Cependant, la formation des bourgeons, solliciterait deux champs morphogénétiques. Il existerait alors, suivant les variétés, un champ internodal (au niveau du "V" formé par les marges d'une gaine foliaire) et un champ nodal (à l'intérieur ou sur toute la largeur du nœud d'une feuille axillaire) [8]. Ces champs sont latents ou actifs pendant la vie de la plante et selon les variétés [39].

Il a été observé dans cette étude, des formations globulaires ayant un aspect blanchâtre à l'obscurité et jaune-verdâtre à la lumière. Les globules sphériques, des structures blanchâtres (à l'obscurité) et jaune verdâtre (à la lumière) ont déjà été décrits par [8] ; [18]. Les bourgeons axillaires ont été observés à la base de l'explant initial au détriment des bourgeons adventifs. D'après les observations de [39], les différences observées sur un même type d'explant seraient liées au site de formation du bourgeon d'une part, à l'exploitation variable de leurs potentialités morphogénétiques en culture *in vitro*, plus précisément à l'AGMA (Activité Globale du Méristème Apical). D'autre part, ces différences observées sur un même type d'explant seraient dues à l'absence d'une synchronisation de ce processus (l'AGMA). Les résultats similaires ont été signalés par [40]; [22]; [39]; [8]. Les sites morphogènes de formation des bourgeons seraient activés ou mis en dormance selon que l'explant soit ou non dans des conditions favorables qui pourraient déclencher la formation des bourgeons [8]. Par ailleurs, dans l'essai de l'évaluation des effets des auxines, il a été observé la présence de cals à la base de l'explant. Les observations similaires ont été faites par [41] ; [42]. L'AIA a souvent donné de faibles pourcentages d'enracinement, surtout quant elle est employée à de faibles concentrations, que ce soit avec le bananier, l'Artichaud [43], [42] ou avec d'autres espèces [44]. Plus on augmente la concentration exogène en obscurité, plus on stimule l'induction de racines, moins on favorise la formation de bourgeons [45]. Le nombre de racines par pousse enracinée est directement proportionnel à la concentration d'ANA dans le milieu de culture [46]. De même, une fréquence plus élevée de l'induction racinaire a été obtenue avec la combinaison AIB et NAA. La réponse de l'AIB à l'induction de racines obtenues dans cette étude serait due à la grande stabilité de l'AIB. L'AIB a une grande capacité pour activer l'enracinement chez plusieurs espèces [47] ; [48]. Cette auxine (AIB) a la capacité de se convertir en AIA [49] ; et aboutir dans les tissus à la formation de l'AIBsp (AIB-acide aspartique). Elle active l'enracinement mieux que l'AIA [50].

## **5 CONCLUSION**

De ces trois auxines évaluées (AIA, AIB et ANA), l'AIA a un effet positif sur la formation de bourgeon. L'AIA réduit le nombre de racines et l'émission foliaire par explant en phase de prolifération de FHIA-01. L'ANA et l'AIB s'avèrent peu efficaces en ce qui concerne la formation de bourgeon. Dans cette étude, l'ANA et l'AIB induisent un nombre important de racines. Au cours de cette étude, il a été observé la formation des structures bulbeuses (cal non conforme) à la base de l'explant suite à l'ajout de l'ANA dans le milieu de culture.

Les milieuxensemencés devront être incubés en salle de culture à l'obscurité continue et la température fixée à  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , jusqu'à la dernière phase de multiplication. Au cours de la phase de multiplication de FHIA-01, les explants doivent êtreensemencés sur un milieu (M1), MS.

Il a été constaté que la prolifération de bourgeons, l'induction de racines, l'émission foliaire et l'induction de cals étaient significativement influencées par les différents milieux et photopériode qui a démontré des corrélations négatives nettement significatives entre la taille d'explant, nombre de feuilles émises, nombre de racines, le poids d'explant avec les bourgeons proliférés. Par ailleurs, les corrélations positives significatives entre les autres paramètres ont été enregistrées à l'exception du nombre de bourgeons.

La culture *in vitro* de bananier et plantain reste un challenge pour les pays tropicaux en développement où les problèmes des attaques des maladies de culture et de la sécurité alimentaire se posent avec acuité. La formulation des milieux de

culture spécifiques aux cultivars selon le groupe (ABB ou AAA, etc.) et le choix des conditions de culture (intensité lumineuse continue ou photopériode) éviteraient des échecs consécutifs et les faibles proliférations lors de la culture *in vitro*.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le laboratoire de Biotechnologie de Hogeschool Gent et le laboratoire de Culture *in vitro* du CARAH asbl (Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la province de Hainaut) en Belgique.

## REFERENCES

- [1] R. Auge, G. Beauchesne, D. Boccon –Gibo, L. Decoutye, B. Digat, R. Jalouzot, R. Minier, C.L. Morand, J.P. Reynoird, G. Strullud, H. Vidalie, La culture *in-vitro* et ses application horticoles. *Ed Lavoisier*, Paris, p 225, 1989
- [2] J. Dewitte, Growth and micropropagation of new banana varieties adapted to the agro-ecological conditions of Lubumbashi. *Hogeschool Gent, Master thesis*, p 145, 2008.
- [3] K.M. Mazinga, G.J. Mario, L.L. Baboy, S.Y. Useni, M. Van Koninckxloo, Détermination des teneurs en phytohormones endogènes des organes caulinaires et racinaires des hybrides de bananier (*Musa* sp.). *Journal of Applied Biosciences* vol 58 pp 4243– 4250, 2012
- [4] J.C. Robinson, Bananas and Plantain. *CAB International*, Cambridge, 1996.
- [5] D.R. Vuylsteke, Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm, Practical manuals for handling crop germoplasm *in vitro*. *Int. Board Plant Genet. Resour.* (IBPGR), Rome, Italy, p55, 1989.
- [6] J. Daniells, M. Smith, Post-flask management of tissue cultured bananas. *ACIAR technical report*. p 8, 1991.
- [7] O. Arias, Commercial micropropagation of banana. In: *Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement. Inibap, San Jose, Costa Rica*. pp. 139-142, 1992.
- [8] T. Koné, M. Koné, D. Koné, T.H. Kouakou, S. Traoré, Y.J. Koudio, Effet de la photopériode et des vitamines sur la micropropagation du bananier plantain (*Musa* AAB) à partir de rejets écaillés de rang1. *Journal of Applied Biosciences* vol 26: 1675 –1686, 2010.
- [9] H. Gübbük, M. Pekmezci, *In vitro* Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.), *Turk. J. Agric. For.* vol 28, pp355-361, 2004.
- [10] A. Assani, R. Haicour, G. Wengel, B. Foroughi-Wehr, F. Bakry, F.X. Côte, G. Ducreux, A. Ambroise, A. Grapin, Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.) *Plant Science* vol 162, pp 355-362, 2002.
- [11] H. Strosse, H. Schoofs, B. Panis, E. Andre, K. Reyniers, R. Swennen, 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Sci* vol 170 pp104–112, 2002.
- [12] H. Strosse, E. Andre, L. Sági, R. Swennen, B. Panis, Adventitious shoot formation is not inherent to micropropagation of banana as it is in maize. *Plant Cell Tiss Organ Cult* vol 95, pp321–332, 2008.
- [13] R. Afza, M. Van Duren, R. Morpurgo, F.J. Novak, Banana tissue culture and its prospective use in developing countries. Pp. 58-70, 1996. In *Plant Tissue Culture* (A.S. Islam, ed.). Oxford et IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi/ Calcutta [Online] Available: [www.springerlink.com/index/606160V880U823R2.pdf](http://www.springerlink.com/index/606160V880U823R2.pdf)
- [14] B.A. Adelaja, Rapid on-farm multiplication technique for plantain and banana. *MusAfrica* vol 8, pp 6-10, 1995.
- [15] T.R. Ganapathi, J.S.S. Mohan, P. Suprasanna, V.A. Bapat, P.S. Rao, A low-cost strategy for *in vitro* propagation of banana. *Current Science* vol 68, pp 646-649, 1995.
- [16] S.R. Dore, N.K.R. Srinivasa, E.K. Chacko, Tissue culture propagation of banana. *Scientia Horticulturae* vol 18, pp 247-252, 1983.
- [17] M. Diekmann, C.A.J. Putter, FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm. No.15. *Musa*. 2 edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. p29, 1996.
- [18] D. Vuylsteke, E. De Langhe, Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Trop. Agric.* Vol 62 n°4, pp323-328, 1985.
- [19] W.C. Wong, *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): initiation, proliferation and development of shoot tip cultures on defined media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol 6, pp159-166, 1986.
- [20] P. Madhulatha, S. Kirubaram, N. Zakihivel, Effects of carbon-sources and auxins on *in vitro* propagation of banana. *Biologia Plantarum* vol 50 n°4, pp782-784, 2006.

- [21] W.B. Michael, W.F. Catherine, J. Van Staden, The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in cavendish banana (*Musa* AAA cv. "zelig"), *Scientia Horticulturae* vol 108, pp 347-351, 2006.
- [22] F.J. Novak, R. Afza, M. Van Duren, M.S. Omar, Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (*Musa* cvs). *Trop. Agric.* Vol 67, pp 21-28, 1990.
- [23] E.N.A. Mbanaso, J. Crouch, F. Onofeghara, Effet de fragmentation et de l'incision sur la culture d'apex de différents génotypes de bananiers à cuire. *Info Musa* vol 15 n°2, pp 30-32, 2006.
- [24] J.C. Lorenzo, B.L. Gonzales, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa, C. Borroto, Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* vol 54 n°3, pp197-200, 1998.
- [25] H. Etienne, M. Berthouly, 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215-231.
- [26] K. Matsumoto, A.C.B. Kaizer, Comparaison des systèmes d'immersion temporaire et permanente pour la culture *in vitro* du bananier. *Info Musa* vol 11 n°2, pp 36-37, 2002.
- [27] M. Sarwar, R.M. Skirvin, M. Kushad, M.A. Norton, Selecting dwarf apple (*Malus X Domestica Borkh.*) three *in vitro*: multiple cytokinin tolerance expressed among three strains of ÔMcIntoshÕ that differ in their growth habit under field conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* Vol 54, pp71-76, 1998.
- [28] P.J. Ainsley, F.A. Hammerschlag, T. Bertozz, G.G. Collins, M. Sedgley, Regeneration of almond from immature seed cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* Vol 67, pp 221-226, 2001.
- [29] M.V. Joshi, N.A. Sahasrabudhe, S. Hazra, 2003. Responses of peanut somatic embryos to thidiazuron. *Biologia Plantarum.* Vol 46 n°2, pp 187-192, 2001.
- [30] M. Kadota, Y. Niimi, Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* Vol 72, pp 261-265, 2003.
- [31] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, vol 15, pp 473-492, 1962.
- [32] I. Van den Houwe, J. Guns, R. Swennen, Bacterial contamination in *Musa* shoot tip cultures, *Acta Hort.* Vol 490, pp 485-492, 1998.
- [33] N.K. Konan, C. Schöpke, R. Cárcamo, R.N. Beachy, C. Fauquet, An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. *Plant Cell Rep* vol 16, pp 444-449, 1997.
- [34] M. Srivatanakul, S.H. Park, J.R. Sanders, M.G. Salas, R.H. Smith, Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. *Plant Cell Rep.* vol 19, pp 1165-1170, 2000.
- [35] M.B. Sticklen, H.F. Oraby, Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In vitro Cell Dev Biol Plant* vol 41, pp 187-200, 2005.
- [36] H. Schoofs, The origin of embryogenic cells in *Musa*. Thèse de PhD, KULeuven, Belgique, p 258, 1997.
- [37] A. Garcia, B. Perez-Mederos, Z. Sarria-Hernandez, J.G. Clavero, Nouvelles méthodes de propagation *in vitro* du cultivar hybride FHIA-20. *INFOMUSA* vol 11 n°1, pp 18-26, 2002.
- [38] T. Mateille, B. Foncelle, Techniques de production de vitro-plants de bananier CV. « Poyo ». P.H.M. *Revue Horticole*, vol 294, n°44, pp 39-45, 1989.
- [39] M. Kwa, Architecture, morphogenèse et anatomie de quelques cultivars de bananiers. *Université Montpellier II*, Thèse, Montpellier, France, p 286, 1993.
- [40] N. Banerjee, E. De Langhe, A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Report.* Vol 4, pp 351-354, 1985.
- [41] G.J. De Klerk, J.T. Brugge, S. Marinova, S. Marinova, Effectiveness of indole acetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious rootformation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* vol 49, pp 39-44, 1997.
- [42] D. Lauzer, J. Vieth, Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L. cv. Green Globe. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* vol 21, pp 237-244, 1990.
- [43] G. Ancora, M.L. Belli-Donini, L. Cuzzo, Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Scientia Horti* vol 4, pp 207-213, 1981.
- [44] G.M. Scarpa, M. Milia, M. Satta, The influence of growth regulators on proliferation and rooting of *in vitro* propagated myrtle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* vol 62, pp 175-179, 2000.
- [45] E.F. George, Plant tissue culture techniques. In: *Plant propagation by tissue culture.* Part 1: The technology, Exegetics Ltd., Edington, Wilts, England, p3-36, 1993.
- [46] L.B. Andrade, S. Echeverrigaray, F. Fracaro, L. Rota, The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* vol 56, pp 79-83, 1999.

- [47] C.C. McCready, Movement of growth regulators in plants. I. Polar transport of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in segments from the petiols of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol* vol 62, pp 3-18, 1963.
- [48] H.T. Hartmann, V. Kester, F.T. Davies, Plant propagation: principles and practices. *Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ*. ISBN; 0-13 681007-1. pp. 246-247, 1990.
- [49] S.S. Cronauer, A.D. Krikorian, Multiplication of *Musa* from excised stem tips. *Annals of Botany*. Vol 53, pp 321-328, 1984.
- [50] Z. Wiesman, J. Riov, E. Epstein, Characterization and rooting ability of indole-3-butyric acid conjugates formed during rooting of mung bean cuttings. *Plant Physiol* vol 91, pp 1080-1084, 1989.