

Katholieke  
Universiteit  
Leuven



FACULTEIT DER WETENSCHAPPEN  
Onderzoek voor de thesis uitgevoerd in het  
LABORATORIUM TROPISCHE PLANTENTEELT  
FACULTEIT DER LANDBOUWWETENSCHAPPEN

**CULTURE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES  
EMBRYOGENIQUES ET REGENERATION EN  
PLANTULES PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE  
CHEZ LE BANANIER ET LE BANANIER PLANTAIN  
(*MUSA SPP.*)**

Promotors :  
Prof. Dr. R. Swennen  
Prof. Dr. J. Vendrig

Proefschrift voorgedragen tot  
het behalen van de graad van  
Doctor in de Wetenschappen  
door  
**DHED'A DJAILO**

Decembre 1992





**CULTURE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES  
EMBRYOGENIQUES ET REGENERATION EN  
PLANTULES PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE  
CHEZ LE BANANIER ET LE BANANIER PLANTAIN  
(*MUSA SPP.*)**

Promotors :

Prof. Dr. R. Swennen

Prof. Dr. J. Vendrig

Leden van Jury :

Prof. Dr. A. Van Laere, K.U.Leuven

Prof. Dr. A. Van Gool, K.U.Leuven

Prof. Dr. M. De Proft, K.U.Leuven

Dr. J. Geuns, K.U.Leuven

Proefschrift voorgedragen tot  
het behalen van de graad van  
Doctor in de Wetenschappen  
door

**DHED'A DJAILO**

UBS 6575644



*A mes parents Bassa et Dhesibu  
A mon frère Dhelo André*



CULTURE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EMBRYOGENIQUES ET REGENERATION  
EN PLANTULES PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ LE BANANIER ET  
LE BANANIER PLANTAIN (*MUSA* SPP.)

	Page
TABLE DE MATIERE	
AVANT PROPOS	
ABBREVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES FIGURES	5
RESUME	11
SUMMARY	13
SAMENVATTING	15
CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE	17
1.1. INTRODUCTION SUR LE BANANIER	17
1.1.1. Description botanique	17
1.1.2. Importance du bananier et du bananier plantain	19
1.1.3. Problème de multiplication chez le bananier	22
1.1.4. Problème de l'amélioration génétique du bananier	22
1.1.5. Suspensions cellulaires et embryogénèse somatique	24
1.1.5.1. Suspensions cellulaires	24
1.1.5.2. Embryogénèse somatique	25
1.2. BUTS ET INTERET DU TRAVAIL	29

CHAPITRE II.	MISE AU POINT DE LA CULTURE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EMBRYOGENIQUES CHEZ CV. BLUGGOE, <i>MUSA ABB</i>	31
2.1.	ETABLISSEMENT DE LA CULTURE IN VITRO DU BANANIER	31
2.1.1.	Introduction	31
2.1.2.	Préparation du milieu de base	31
2.1.3.	Etablissement de la culture <i>in vitro</i>	33
2.1.4.	Maintenance du stock de culture	33
2.2.	INITIATION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES	36
2.2.1.	Introduction	36
2.2.2.	Matériel et méthodes	36
2.2.2.1.	Le matériel végétal	36
2.2.2.2.	L'explant	37
2.2.2.3.	Effet de quelques régulateurs de croissance	38
2.2.2.4.	Effet de l'âge de la subculture de prolifération	38
2.2.2.5.	Etablissement des suspensions cellulaires embryogéniques	39
2.2.3.	Résultats et discussion	40
2.2.3.1.	Initiation de suspensions	40
2.2.3.2.	Effet de quelques régulateurs de croissance	40
2.2.3.3.	Effet de l'âge de la subculture de prolifération	48
2.2.3.4.	Etablissement des suspensions cellulaires embryogéniques	49
2.2.4.	Conclusions	53

2.3.	MAINTENANCE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EMBRYOGENIQUES	54
2.3.1.	Introduction	54
2.3.2.	Matériel et méthodes	54
2.3.2.1.	Essai de maintenance	54
2.3.2.2.	Maintenance proprement dite	55
2.3.3.	Résultats et discussion	56
2.3.3.1.	Essai de maintenance	56
2.3.3.2.	Maintenance proprement dite	63
2.3.4.	Conclusions	68
2.4.	REGENERATION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EN PLANTULES	69
2.4.1.	Introduction	69
2.4.2	Matériel et méthodes	69
2.4.2.1.	Régénération de suspensions cellulaires en plantules	69
2.4.2.2.	Etude de la variation somaclonale des plantes issues d'embryons somatiques en culture de suspensions cellulaires	72
2.4.3.	Résultats et discussion	73
2.4.3.1.	Régénération de suspensions cellulaires en plantules	73
2.4.3.2.	Variation somaclonale	80
2.4.4.	Conclusions	83

CHAPITRE III. ETUDES MORPHOLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE EN CULTURE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES	86
3.1. Introduction	86
3.2. Matériel et méthodes	86
3.2.1. Origine de cellules embryogéniques en suspensions	86
3.2.2. Evolution des cellules embryogéniques en embryons somatiques et en plantules	87
3.3. Résultats et discussion	88
3.3.1. Origine de cellules embryogéniques en suspensions	88
3.3.2. Evolution des cellules embryogéniques en embryons somatiques et en plantules	95
3.4. Conclusions	110
CHAPITRE IV. INITIATION DE SUSPENSION CELLULAIRES CHEZ D'AUTRES VARIETES	111
4.1. Introduction	111
4.2. Matériel et méthodes	112
4.2.1. Effet de la concentration de 100 $\mu$ M BAP sur la prolifération	112
4.2.2. Effet de la prolifération en présence de 100 $\mu$ M BAP sur l'initiation de suspension cellulaires	112
4.3. Résultats et discussion	113
4.3.1. Effet de la concentration de 100 $\mu$ M BAP sur la prolifération	113
4.3.2. Effet de la prolifération en présence de 100 $\mu$ M BAP sur l'initiation de suspension cellulaires	118
4.3.2.1. Production des globules méristématiques	118
4.3.2.2. Production des cellules et groupes embryogéniques	123

4.3.3.	Régénération des suspensions en plantules	127
4.4.	Conclusions	128
CHAPITRE V. ESSAI D'OPTIMALISATION DE LA PREPARATION DE L'EXPLANT POUR L'INITIATION DE SUSPENSIONS EMBRYOGENIQUES		129
5.1.	Introduction	129
5.2.	Matériel et Méthodes	132
5.2.1.	Effet de la zéatine en milieu de prolifération	132
5.2.2.	Effet du 2,4-D en milieu semi-solide	132
5.2.3.	Initiation en présence de 50 $\mu$ M 2,4-D	133
5.3.	Résultats et discussion	133
5.3.1.	Effet de la zéatine en milieu de prolifération	133
5.3.2.	Effet du 2,4-D en milieu semi-solide	136
5.3.3.	Initiation en présence de 50 $\mu$ M 2,4-D	142
5.4.	Conclusions	146
CHAPITRE VI. CONCLUSIONS GENERALES		147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		152
ANNEXES		168

## AVANT PROPOS

Au terme de ce travail, qu'il me soit permis de remercier toutes les personnes qui de près ou de loin, matériellement ou moralement ont contribué à sa réalisation.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu au Prof. E. De Langhe pour avoir accepté de diriger ce travail malgré la lourde charge qu'il avait comme Directeur du Réseau International pour l'Amélioration du Bananier et Bananier Plantain (INIBAP) à Montpellier (France). Ses remarques, suggestions et encouragements ont été des éléments déterminants pour l'aboutissement de ce travail. Qu'il me soit aussi permis d'adresser mes sentiments de gratitude au Dr. Françoise Dumortier pour m'avoir accueilli, pour avoir guidé mes premiers pas expérimentaux et pour avoir œuvré à mon intégration rapide au sein du Laboratoire. Que le Prof. R. Swennen Promoteur de ce travail, successeur du Prof. De Langhe, reçoive ici tous mes remerciements pour tout son savoir et son cœur qu'il a mis pour parachever ce travail. Je ne saurais passer sous silence le nom du Prof J. Vendrig, co-promoteur de ce travail, à qui j'adresse mes sincères remerciements. Je remercie également, le Prof. E. Richelle-Maurer pour avoir accepté de relire le manuscrit de ce travail.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la participation financière de l'Administration Générale pour la Coopération au Développement du Gouvernement belge (AGCD) par la bourse d'études qu'il a octroyé pour mon séjour en Belgique. Je l'en remercie et remercie Mlle Henry pour son encadrement administratif et social. Je remercie aussi le Prof. H. Gevaerts pour les contacts nécessaires établis pour permettre mon arrivée en formation en Belgique alors qu'il était Doyen de la Faculté des Sciences à l'Université de Kisangani et gestionnaire du Projet de coopération de l'AGCD dans cette Faculté.

Que Bart Panis, Dirk Vuylsteke et Kris de Smet, pour leur collaboration scientifique, Suzy Voets et Wim Dillemans, pour leur collaboration technique et toute l'équipe du Laboratoire de Culture Tropicale (Laboratorium Tropische Plantenteelt), pour des heures de travail accompli dans la joie, trouvent ici l'expression de toute mon amitié.

Que soient aussi remerciés le Dr. C. Teisson, le Dr. J. Schwendiman et le Dr. N. Michaux-Ferrière du CIRAD (Montpellier, France) et toutes les personnes dont les noms ne sont pas mentionnés ici avec lesquelles nous avons eu l'occasion de discuter d'une manière constructive au cours de la réalisation de ce travail.

Que Bebwa, Dhetchuvi, Dudu, Kazadi et leurs familles ainsi que Apema, Iskra Panova, Soki, Ulyel, et des nombreuses autres personnes dont les noms ne sont pas cités ici trouvent à travers ces lignes l'expression de notre profonde gratitude pour leur sincère amitié.

Enfin, que Mon épouse Anne Marie Asindele, mes enfants, mes parents et les membres de ma famille reçoivent, pour les sacrifices de longue séparation, l'expression de mes sincères sentiments de reconnaissance et considèrent ce travail comme le fruit des sacrifices consentis.

Dhed'a Djailo Benoît



## ABBREVIATIONS

<b>2,4-D:</b>	Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
<b>ABA:</b>	Acide absicique
<b>ACIAR:</b>	Australian Centre for International Agricultural Research.
<b>ADN:</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AIA:</b>	Acide $\beta$ indole acétique
<b>AMPc:</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>ANA:</b>	Acide $\alpha$ naphtalène acétique
<b>BAP:</b>	6-Benzylaminopurine
<b>CATIE:</b>	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
<b>CIRAD:</b>	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
<b>CW:</b>	Coconut Water (lait de noix de coco)
<b>FAA:</b>	Formaldéhyde-Acide acétique glacial-Alcool
<b>FAO:</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FDA:</b>	Fluorescéine diacétate
<b>FHIA:</b>	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
<b>IAPTC:</b>	International Association of Plant Tissue Culture
<b>IITA:</b>	International Institute of Tropical Agriculture
<b>INIBAP:</b>	International Network for improvement of Banana and Plantain
<b>IPGRI:</b>	International Plant Genetic Resources Institute
<b>IRAZ:</b>	Institut de Recherche Agronomique et Zootechnique de la Communauté des Pays des grands lacs (Zaïre, Rwanda, Burundi)
<b>IRFA:</b>	Institut de Recherche sur les Fruits et Agrumes

- K.U.Leuven:** Katholieke Universiteit Leuven
- MS:** Murashige and Skoog
- PAS:** Periodic Acid Schiff
- PCARRD:** Philippine Council for Agriculture and Resources Research and Development
- QDPI:** Queensland Department of Primary Industries
- TTC:** Triphenyl tetrazolium chloride
- UPLB:** University of the Philippines at Los Baños

## LISTE DES TABLEAUX

Page

Tableau 1.	Composition du milieu de Murashige et Skoog modifié pour la culture <i>in vitro</i> de bananier telle qu' utilisé à la K.U.Leuven	32
Tableau 2.	Composition des milieux essayés pour la maintenance de suspensions	55
Tableau 3.	Fréquence de régénération de suspensions cellulaires et types de structures régénérées sous l'effet de la concentration de cytokinine en milieu liquide de maturation (étape 2) et en milieu semi-solide de régénération (étape 3).	79
Tableau 4.	Type de milieu et temps requis pour la culture de suspensions cellulaires embryogéniques et leur régénération en plantules chez le bananier en utilisant l'apex caulinaire comme explant	85
Tableau 5.	Nombre de bourgeons produits en présence de 10 $\mu\text{M}$ et de 100 $\mu\text{M}$ BAP	114
Tableau 6.	Taux de prolifération au cours de 5 subcultures successives chez 13 variétés de bananier (milieu de prolifération: 1 $\mu\text{M}$ AIA et 100 $\mu\text{M}$ BAP) (observations à 3 semaines d'intervalle)	117
Tableau 7.	Nombre de globules méristématiques produits au cours de 3 répétitions chez 13 variétés de bananier (milieu: 5 $\mu\text{M}$ 2,4-D, 1 $\mu\text{M}$ zéatine; observation après 8 semaines)	119

Tableau 8.	Degré de noircissement du milieu à 8 semaines au cours de 3 répétitions chez 13 variétés de bananier (milieu de culture: 5 $\mu$ M 2,4-D, 1 $\mu$ M zéatine). Rafrâichissement du milieu effectué après les 5 premières semaines de la culture	120
Tableau 9.	Production des groupes embryogéniques au cours de 3 répétitions chez 13 variétés en cultures d'initiation (après 8 mois d'observations)	124
Tableau 10.	Prolifération sur 1 $\mu$ M AIA avec BAP ou zéatine (observations après 3 semaines)	134
Tableau 11.	Effet du 2,4-D en milieu semi-solide (2,4-D + 100 $\mu$ M cytokinine) (observations après 3 semaines)	141
Tableau 12.	Effet du 2,4-D en milieu de prolifération chez Igitsiri (AAA) et Agbagba (AAB) (observations après 6 semaines)	143
Tableau 13.	Production de globules méristématiques (observations à 8 semaines) et groupes embryogéniques chez Bluggoe (ABB) (observations à 14 semaines)	144

LISTE DES FIGURES		Page
Figure 1.	Représentation schématique d'un bananier à maturité avec son régime et ses rejets	17
Figure 2.	Différents niveaux de dégénérescence florale chez le bananier plantain	18
Figure 3.	Production mondiale de bananes et bananes plantains	19
Figure 4.	Production mondiale par tête d'habitant de bananes et bananes plantains	20
Figure 5.	Système d'échange de germoplasme de bananier	21
Figure 6.	Evolution d'un embryon zygotique globulaire d'une dicotylédone dans diverses conditions	26
Figure 7.	Comparaison entre l'embryogénèse zygotique et l'embryogénèse somatique chez une dicotylédone	26
Figure 8a.	Différents stades du développement de l'embryon zygotique chez une dicotylédone ( <i>Capsella bursa-pastoris</i> )	27
Figure 8b.	Différents stades du développement de l'embryon zygotique d'un monocotylédone ( <i>Cocos nucifera</i> )	27
Figure 9.	Matériel de départ pour la culture <i>in vitro</i> du bananier	34
Figure 10.	Initiation de la culture <i>in vitro</i> de prolifération de bourgeons méristématiques	35
Figure 11.	Nombre total de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) en présence du BAP et de lait de coco 8 semaines après inoculation des scalps	41
Figure 12.	Nombre total de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) en présence de BAP, kinétine et AMPc 8 semaines après inoculation des scalps	42

Figure 13.	Nombre total de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) en présence de BAP et zéatine 8 semaines après inoculation des scalps	43
Figure 14.	Evolution du nombre de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) sous l'effet de BAP et de zéatine	44
Figure 15.	Nombre de cellules totales (ovales + allongées) en fonction du nombre de globules 8 semaines après initiation pour des traitements différents	46
Figure 16.	Evolution du nombre de cellules ovales et allongées après initiation de suspension (un rafraîchissement du milieu a été effectué à 4 semaines après initiation) (milieu: 1/2 MS + 5 $\mu$ M 2,4-D + 1 $\mu$ M zéatine)	47
Figure 17.	Evolution du nombre total de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) suivant l'âge de la subculture de prolifération à l'origine de l'explant au début de l'initiation (milieu: 1/2 MS + 5 $\mu$ M 2,4-D + 5% CW)	48
Figure 18.	Culture d'initiation de suspensions cellulaires embryogéniques	50
Figure 19.	Effet du milieu de maintenance sur le nombre total de cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu	56
Figure 20.	Effet du milieu de maintenance sur le nombre de groupes embryogéniques ( $\phi < 0,5$ mm) après rafraîchissement et dilution du milieu	57

Figure 21.	Effet des milieux de maintenance sur la viabilité de cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu	58
Figure 22.	Effet de dilution à la 3ème semaine sur la viabilité de cellules libres chez cv. Bluggoe (milieu C: 3/4 MS + 10 $\mu$ M 2,4-D + 1 $\mu$ M zéatine)	59
Figure 23.	Effet du milieu de maintenance sur le nombre total de cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu	60
Figure 24.	Effet du milieu de maintenance sur le nombre de groupes embryogéniques après rafraîchissement et dilution du milieu	61
Figure 25.	Effet du milieu de maintenance sur la viabilité de cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu	61
Figure 26.	Evolution du nombre total de cellules libres au cours de la maintenance après subculture et dilution de la culture (milieu 1/2 MS + 5 $\mu$ M 2,4-D + 1 $\mu$ M zéatine)	64
Figure 27.	Evolution du nombre de cellules embryogéniques libres au cours de la maintenance après subculture et dilution de la culture (milieu 1/2 MS + 5 $\mu$ M 2,4-D + 1 $\mu$ M zéatine)	65
Figure 28.	Evolution du nombre de groupes embryogéniques ( $\phi < 0,5$ mm) au cours de la maintenance après subculture et dilution de la culture (milieu 1/2 MS + 5 $\mu$ M 2,4-D + 1 $\mu$ M zéatine)	65

Figure 29.	Croissance de suspensions cellulaires embryogéniques de <i>Musa</i> au cours de la maintenance (% packed cell volume)	66
Figure 30.	Schéma de la régénération de suspensions cellulaires embryogéniques en plantules	71
Figure 31.	Culture de régénération de suspensions en plantules	74
Figure 32.	Germination des embryons somatiques sur milieu semi-solide	75
Figure 33.	Détail de germination sur milieu semi-solide	75
Figure 34.	Production d'innombrables plantules en milieu liquide	76
Figure 35.	Détail des plantules issues d'embryons somatiques montrant des apex caulinaires et des ébauches racinaires	76
Figure 36.	Fréquence de régénération des embryons somatiques en milieu liquide de germination avec cytokinine	77
Figure 37.	Plantules de bananier issues d'embryons somatiques se développant sur milieu semi-solide sans régulateur de croissance	82
Figure 38.	Plantes issues d'embryons somatiques en croissance normale sous serres	82
Figure 39.	Représentation schématique de cultures de suspensions cellulaires embryogéniques et de régénération de plantes à partir d'elles chez <i>Musa</i> ABB, cv. Bluggoe	84
Figure 40.	Coupe dans un scalp prélevé 2 semaines après la dernière subculture de prolifération	89
Figure 41.	Formation des masses proembryogéniques et leur évolution en globules méristématiques	91
Figure 42.	Globules méristématiques	92



Figure 43.	Formation des cellules et groupes embryogéniques	94
Figure 44.	Vue microscopique d'une suspension cellulaire embryogénique	96
Figure 45.	Vue microscopique à l'état frais d'une culture en phase de régénération	97
Figure 46.	Formation d'embryons globulaires à partir de cellules isolées	98
Figure 47.	Formation d'embryons globulaires	99
Figure 48.	Stades cordiformes dans l'embryogénèse somatique	101
Figure 49.	Stades cotylédonnaires de l'embryogénèse somatique et zygotique	101
Figure 50.	Jeune embryon de <i>Cocos nucifera</i>	102
Figure 51.	Embryon somatique mature se développant en milieu liquide	104
Figure 52.	Embryons somatiques matures se développant sur milieu semi-solide	104
Figure 53.	Embryon zygotique mature	105
Figure 54.	Aspect de la germination d'embryon somatique et zygotique vu sous microscope électronique à balayage	106
Figure 55.	Formation d'embryons somatiques adventifs à partir d'embryons somatiques globulaires en désorganisation en milieu de maturation (vue en microscopie électronique à balayage)	108
Figure 56.	Coupe histologique d'embryons somatiques adventifs	109
Figure 57.	Prolifération sur 10 et 100 $\mu$ M BAP	115
Figure 58.	Comparaison qualitative de la grandeur des globules méristématiques chez 3 cultivars	122

Figure 59.	Régimes de 5 variétés de bananier ayant produit des suspensions cellulaires embryogéniques	126
Figure 60.	Hypothèse pour optimiser la production de suspensions cellulaires embryogéniques	131
Figure 61.	Effet de zéatine en milieu semi-solide	135
Figure 62.	Induction de la callogénèse chez le bananier sous l'effet du 2,4-D en milieu semi-solide	137
Figure 63.	Histologie d'un cal avec formation nodulaire à partir de la région périvasculaire	138
Figure 64.	Histologie d'un cal avec formation nodulaire à partir d'un protoderme à la surface d'un cal	140

## RESUME

Ce travail a pour objectifs l'initiation des suspensions cellulaires embryogéniques à partir du tissu somatique, la maintenance de ces suspensions et leur régénération en plantules par embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.).

La mise au point de la procédure de culture de suspensions cellulaires a été établie en utilisant le cultivar Bluggoe (*Musa* spp., groupe ABB).

L'initiation des suspensions a été effectuée en utilisant des explants (scalps) prélevés sur des bourgeons méristématiques en prolifération sur 1  $\mu$ M AIA et 10  $\mu$ M BAP. Ces explants ont été inoculés dans le milieu liquide de Murashige et Skoog dont les macroéléments et le fer ont été dilués de moitié, additionné de 30 g/l de saccharose, 5  $\mu$ M 2,4-D et 1  $\mu$ M zéatine ou 5% CW.

Les suspensions cellulaires obtenues après 16-24 semaines ont été maintenues dans les mêmes milieux et dans les mêmes conditions de culture.

La régénération des suspensions en plantules a été réalisée en suivant 4 étapes, en utilisant des milieux sans 2,4-D et a été obtenue aussi bien sur milieu semi-solide qu'en milieu liquide en présence d'une cytokinine. 10 à 14,5% de plantules issues d'embryons somatiques normaux ont pu être régénérés. La fréquence totale de régénération a atteint jusqu'à 23,1%.

Les plantules régénérées, transplantées en plein champ à l'IITA (Nigeria), se sont développées normalement et n'ont produit que 0,7% de somavariants. Les études histologiques ont montré l'origine périvasculaire des cellules embryogéniques en suspension. La régénération a suivi la voie de l'embryogénèse somatique, laquelle a montré à tous les stades des

ressemblances remarquables avec l'embryogénèse zygotique chez des diploïdes sauvages.

La reproductibilité de cette procédure de culture cellulaire a été montrée chez différentes variétés. Celles-ci, proliférées en présence de 100  $\mu$ M BAP, ont permis l'obtention des suspensions cellulaires embryogéniques chez 5 variétés au total dont *Musa balbisiana* (BB), Bluggoe (ABB), Saba (ABB), Cardaba (ABB) et Three Hand Planty (AAB) avec une fréquence plus élevée et une durée plus courte de 6 semaines chez Bluggoe. Une suspension cellulaire qu'on pouvait subcultiver, mais constituée des cellules très riches en amidon, a aussi été obtenue chez Yangambi (AAA). La régénération des suspensions embryogéniques a suivi le même schéma que celui de Bluggoe avec un taux de régénération pouvant atteindre 54,4% chez *M. balbisiana*.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible d'obtenir des suspensions cellulaires embryogéniques chez beaucoup de cultivars avec des probabilités et des difficultés variables.

Les recherches en cours (non publiées) ont montré que les suspensions cellulaires embryogéniques constituent un matériel de choix pour la cryoconservation, l'isolement et la régénération des protoplastes et la manipulation génétique du bananier et du bananier plantain.

## ABSTRACT

CELL SUSPENSION CULTURE AND PLANT REGENERATION THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS IN BANANAS AND PLANTAINS (*MUSA* SPP.)

The objectives of this work were to initiate embryogenic cell suspensions from somatic tissue, to maintain the suspensions and to regenerate plants therefrom through somatic embryogenesis in bananas and plantains (*Musa* spp.).

The cell suspension protocol was established using the cultivar Bluggoe (*Musa* spp., ABB group).

The initiation of the suspensions was achieved using explants (scalps) excised from meristematic buds proliferating on 1  $\mu$ M IAA and 10  $\mu$ M BAP. The explants were inoculated into liquid medium of Murashige and Skoog with half strength macroelements and iron, supplemented with 30 g/l saccharose, 5  $\mu$ M 2,4-D and 1  $\mu$ M zeatine or 5% CW.

Embryogenic cell suspensions were established after 16-24 weeks and were maintained in the same medium and culture conditions.

Plant regeneration from the suspensions was achieved following 4 steps using definite media without 2,4-D in the presence of cytokinine, either in liquid or on semi-solid medium. Normal somatic embryos have been regenerated at the rate of 10-14.5%. Total plant regeneration frequency could reach 23.1%.

The regenerated plantlets transplanted into the field at IITA (Nigeria) have shown normal growth with only 0.7% of somaclonal variation.

Histological studies have demonstrated the perivascular origin of the embryogenic cells in suspension. The regeneration followed the pathway of somatic embryogenesis which showed at all stages conspicuous resemblance with zygotic embryogenesis in wild diploides.

The reproducibility of this cell culture protocol was investigated using different varieties. These varieties, proliferated on 100  $\mu$ M BAP, allowed to establish embryogenic cell suspensions for 5 varieties in total (*Musa balbisiana* (BB), Bluggoe (ABB), Saba (ABB), Cardaba (ABB) and Three Hand Planty (AAB)) at a higher frequency and after a period of time reduced by 6 weeks for Bluggoe. A maintainable cell suspension, but with cells rich in starch, was also obtained for Yangambi (AAA). Regeneration followed the same pattern as for Bluggoe with a regeneration rate reaching 54.4% in *Musa balbisiana*.

These results show that it is possible to obtain embryogenic cell suspensions in a wide range of cultivars with variable probabilities and difficulties.

The on-going researches (not published) have shown that embryogenic cell suspensions are the material of choice for cryopreservation, isolation and regeneration of protoplasts and for genetic manipulation of bananas and plantains.

## SAMENVATTING

### CELSUSPENSIEKWEEK EN PLANTREGENERATIE VIA SOMATISCHE EMBRYOGENESE IN BANAAN EN PLANTAAN (*MUSA* SPP.)

De doelstellingen van dit onderzoek waren het initiëren van embryogene celsuspensies uit somatisch weefsel, het onderhouden van de suspensies en het regenereren van planten hieruit via somatische embryogenese in banaan en plantaan (*Musa* spp.).

Het protocol voor de celsuspensieweek werd op punt gesteld met de cultivar Bluggoe (*Musa* spp., ABB groep).

Voor de initiatie van de suspensies werd gebruik gemaakt van explanten (scalps) uitgesneden uit meristematische knoppen die prolifererden op 1  $\mu$ M IAA en 10  $\mu$ M BAP. De explants werden geënt in vloeibaar Murashige en Skoog medium met gehalveerde macro-elementen en ijzer concentraties, aangevuld met 30 g/l saccharose, 5  $\mu$ M 2,4-D en 1  $\mu$ M zeatin of 5% cocosnootmelk.

Embryogene celsuspensies werden bekomen na 16-24 weken en onderhouden in hetzelfde medium en onder dezelfde kweekomstandigheden. Plantregeneratie uit deze suspensies werd bekomen in 4 stappen met elk een specifiek medium zonder 2,4-D, met cytokinine en ofwel vloeibaar ofwel halfvast. Normale somatische embryo's werden geregeneerd met een frekwentie van 10-14,5%. De totale frekwentie van plantregeneratie kon 23,1% bedragen. De geregeneerde plantjes werden in het veld op het IITA (Nigeria) uitgeplant. Zij vertoonden een normale groei met een frekwentie aan somaclonale varianten van slechts 0,7%.

Histologische studies hebben de perivaskulaire oorsprong van de embryogene cellen aangetoond. De plantregeneratie verliep volgens echte somatische embryogenese, waarbij alle stadia een opvallende gelijkenis met zygotische embryogenese in de wilde soorten vertoonden.

De reproduceerbaarheid van dit protocol van de celsuspensiekweek werd nagegaan voor verschillende variëteiten. Deze variëteiten, welke waren vermeerderd op een medium met 100  $\mu$ M BAP, resulteerden in het bekomen van embryogene celsuspensies voor in het totaal 5 variëteiten, namelijk *Musa balbisiana* (BB), Bluggoe (ABB), Saba (ABB), Cardaba (ABB) en Three Hand Planty (AAB). Deze positieve resultaten werden aan een hogere frekwentie bekomen en na een periode die 6 weken korter was voor Bluggoe. Bovendien werd een houdbare celsuspensie, die echter bestond uit cellen rijk aan zetmeel, bekomen voor de cultivar Yangambi (AAA). De plantregeneratie verliep volgens hetzelfde patroon als bij Bluggoe, met een regeneratiefrekwentie tot 54,4% voor *M. balbisiana* (BB).

Deze resultaten tonen aan dat het mogelijk is embryogene celsuspensies te bekomen voor een brede waaier aan cultivars met verschillende waarschijnlijkheden en moeilijkheden.

Het momenteel lopende onderzoek heeft reeds aangetoond dat deze embryogene celsuspensies het materiaal bij uitstek zijn voor cryopreservatie, isolatie van en plantregeneratie uit protoplasten en als uit gang materiaal voor genetische manipulatie van bananen en plantanen.



## CHAPITRE I. INTRODUCTION

### 1.1. INTRODUCTION SUR LE BANANIER

#### 1.1.1. DESCRIPTION BOTANIQUE

Les bananiers et bananiers plantains appartiennent au genre *Musa*, à la famille des Musaceae, à la Section des Eumusa, à l'Ordre des Zingiberales (Simmonds, 1966). La description schématique du bananier est reprise sur la figure 1 et celle des principaux groupes de bananiers plantains, sur la figure 2.

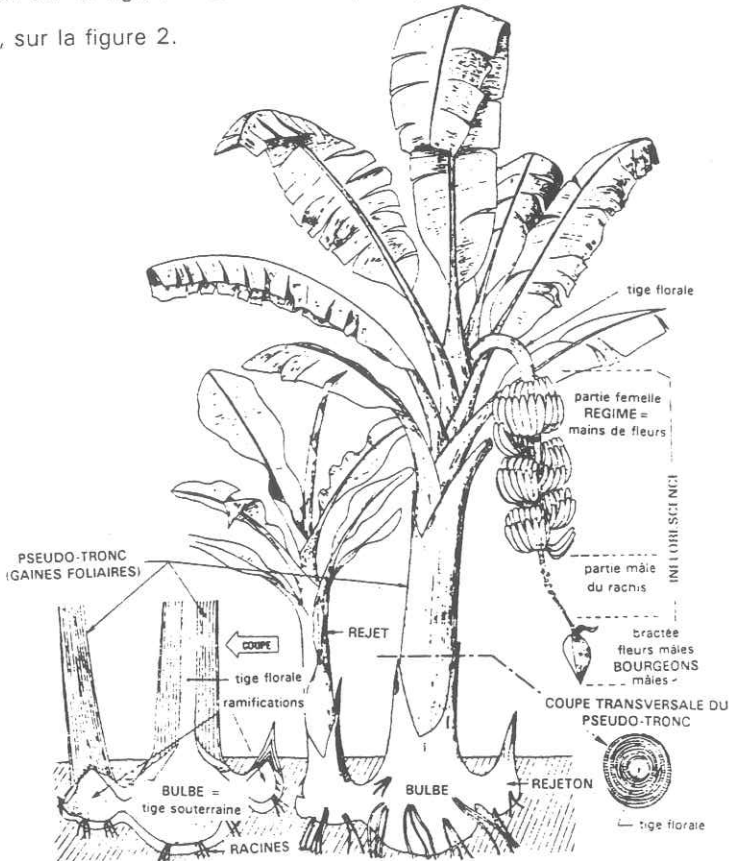


Fig. 1.

Représentation schématique d'un bananier à maturité avec son régime et ses rejets (Champion, 1963)

Les bananiers cultivés sont considérés comme étant le résultat d'hybridations très anciennes entre les espèces diploïdes sauvages de *Musa acuminata* (génome A) et de *Musa balbisiana* (génome B) (Simmonds and Shepherd, 1955). Le nombre chromosomique de base est  $n = 11$ . On trouve dans la nature les génotypes AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB et ABBB. Les génotypes AAAA et AAAB connus sont ceux obtenus à travers certains programmes d'amélioration (Stover and Simmonds, 1987; Swennen and Vuylsteke, sous presse).

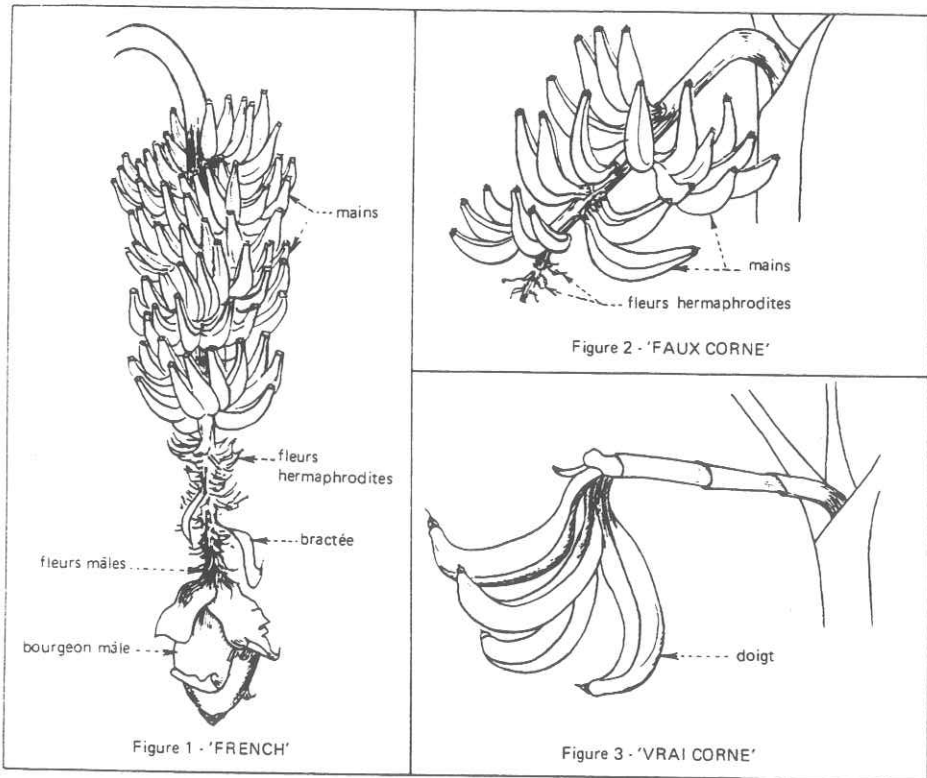


Fig. 2. Différents niveaux de dégénérescence florale chez le bananier plantain (Tezenas du Montcel *et al*, 1983)

### 1.1.2. IMPORTANCE DU BANANIER ET DU BANANIER PLANTAIN

Les bananes et bananes plantains constituent une ration importante dans l'alimentation des populations des pays tropicaux et subtropicaux (INIBAP, sd; Swennen and Vuylsteke, 1991). Les chiffres de production et de consommation de la banane et de la banane plantain dans le monde d'après la FAO (1989) sont illustrés par les figures 3 et 4.

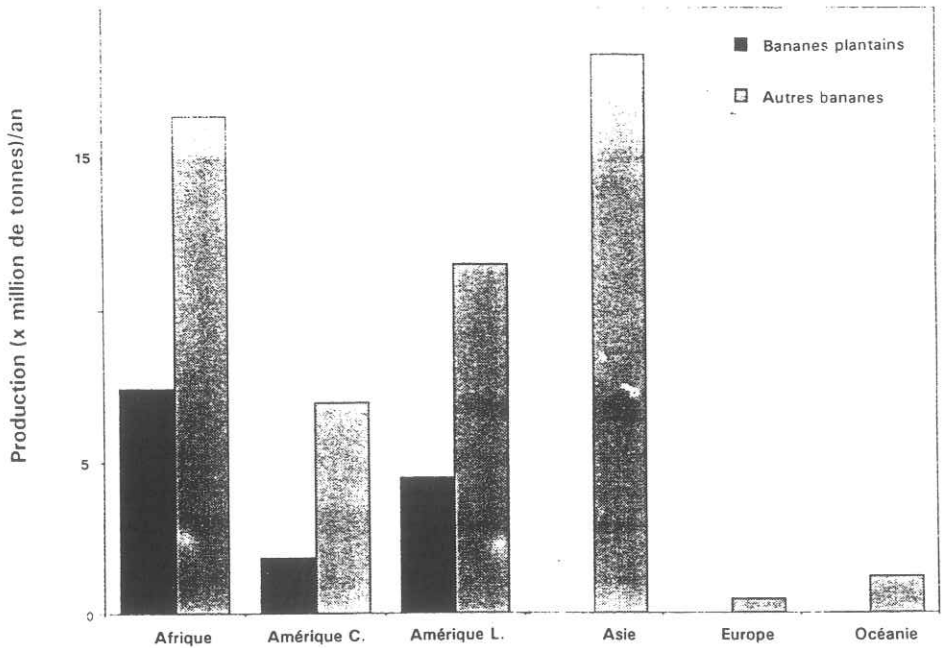


Fig. 3. Production mondiale de bananes et bananes plantains (FAO, 1989)

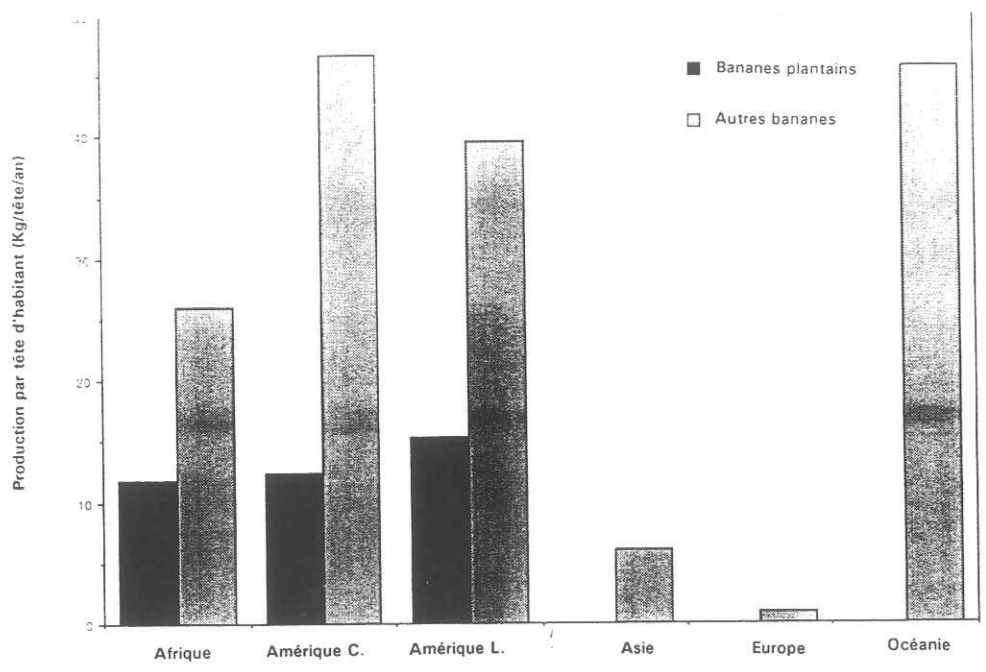


Fig. 4. Production mondiale par tête d'habitant de bananes et bananes plantains (FAO, 1989)

Compte tenu de l'importance de la plante, un réseau international "International Network for the Improvement of Bananas and Plantains" (INIBAP) a été créé en 1984 (INIBAP, 1988). Celui-ci coordonne, supporte et encourage les activités de recherches, d'échanges de documentations, de formation dans tous les domaines touchant le bananier. Ses activités de collections et d'échanges de matériel sain de bananier se fait suivant le schéma de la figure 5 (INIBAP, 1990).

# Musa Germplasm Exchange System

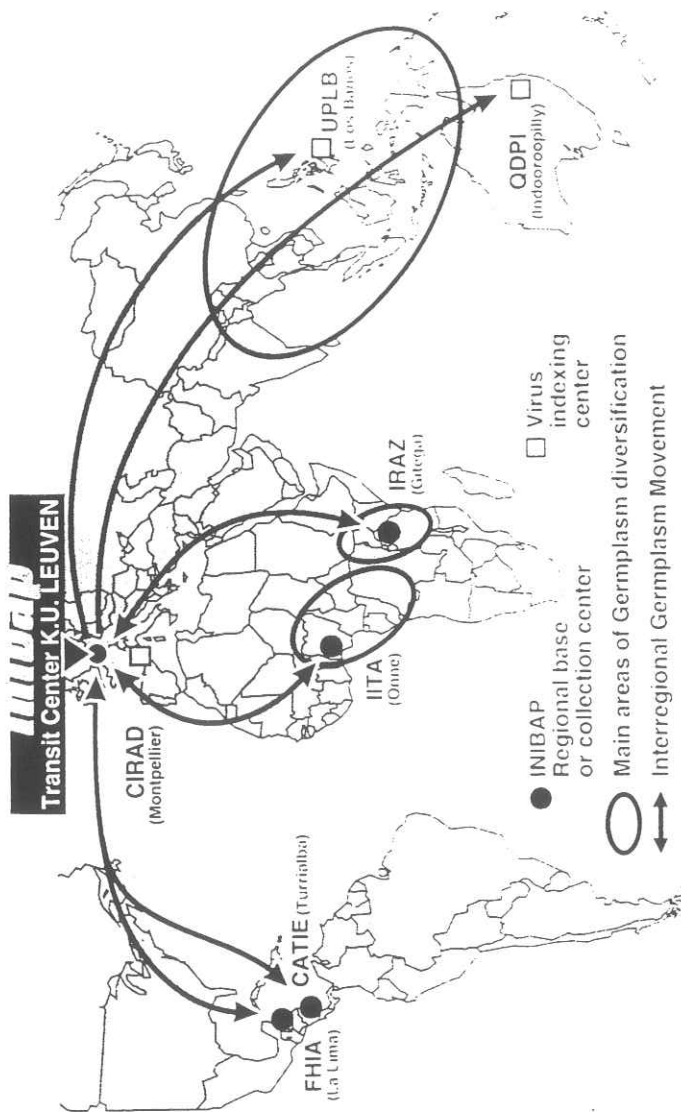


Fig. 5. Système d'échange de germoplasme de bananier (INIBAP, 1990)

### 1.1.3. PROBLEME DE MULTIPLICATION CHEZ LE BANANIER

La majorité des bananiers et des bananiers plantains que l'on rencontre dans le monde sont des triploïdes qui ne produisent pas de graines fertiles (De Langhe, 1987). Leur multiplication se fait par voie végétative. Bien que de nombreuses recherches aient été effectuées en vue d'accroître le taux de rejetonnage (Barker, 1959; De Langhe, 1961; Hamilton, 1965; Swennen and Wilson, 1982, 1983; Swennen, 1984, 1990; De Langhe *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1985), ce mode de reproduction demeure cependant limité à grande échelle. Récemment, la possibilité de multiplication *in vitro* à partir des méristèmes a été considérée (Berg and Bustamte, 1974; Ma *et al.*, 1974; De Guzman *et al.*, 1980), sa faisabilité étudiée et éprouvée (Krikorian and Cronauer, 1984; Vuylsteke and De Langhe, 1985, Banerjee *et al.*, 1986; Vuylsteke, 1989). En effet, le taux de multiplication *in vitro* est non seulement de loin supérieur à celui obtenu en champs, mais encore, les plantules obtenues *in vitro* sont saines, exemptes de charançons, de nématodes, de champignons et de bactéries, mais non de viroses. C'est pourquoi, les techniques de culture *in vitro* de bananier sont actuellement recommandées par la FAO/IPGRI (Frison and Putter, 1989) pour les échanges de germoplasmes de bananier sous l'égide de l'INIBAP.

### 1.1.4. PROBLEME DE L'AMELIORATION GENETIQUE DU BANANIER

Les méthodes d'amélioration des bananiers et bananiers plantains sont restées sans grand succès jusqu'à nos jours. Les raisons probables de cette difficulté d'amélioration par les méthodes conventionnelles sont un haut niveau de stérilité du à la polyploïdie (Persley and De Langhe,

1987), le taux faible de germination des graines hybrides, la fluctuation saisonnière dans la formation de graines (Swennen *et al.*, 1991) et un long cycle végétatif. Malgré ces difficultés, quelques nouvelles lignées ont été obtenues grâce aux techniques conventionnelles (Rowe, 1987; Swennen and Vuylsteke, sous presse). D'après Shepherd (1987), il y a lieu d'être optimiste en ce qui concerne le développement de nouveaux cultivars, étant donné qu'il y a actuellement d'importants programmes d'amélioration en Amérique pour les bananiers desserts et en Afrique pour les bananiers plantains. A l'IITA à Onne (Nigeria), 19 clones de bananier plantain résistants à la cercosporiose noire ou la maladie de raie noire causée par *Mycosphaerella fijiensis* ont été développées en croisant des bananiers plantains triploïdes avec des diploïdes sauvages (Swennen and Vuylsteke, sous presse).

L'attention est de plus en plus tournée vers les méthodes alternatives étant donné le besoin croissant d'obtenir des cultivars résistants aux principaux pathogènes: la cercosporiose noire due à *Mycosphaerella fijiensis* Leach et la cercosporiose jaune due à *M. musicola*, la maladie de Panama due au *Fusarium oxysporum* Schlecht f. cubense, la maladie de Moko due au *Pseudomonas solanacearum* F.F.sun, le Bunchy-top dû à un virus, les nématodes et les charançons). Les progrès récents en biotechnologie ont fait croître l'intérêt de la culture *in vitro* et le développement des techniques de la manipulation génétique du bananier. Un important défi a alors été de cultiver des cellules isolées, des petits groupes cellulaires, des protoplastes et la régénération à partir d'eux des plantes entières, de préférence, par voie d'embryogénèse somatique sans passer par la callogénèse. Cette dernière voie semble non seulement produire des plantes moins vouées aux variations génétiques (Kobayashi,

1987; Vasil, 1987; Ammirato, 1989) mais encore, présente d'autres avantages liés à la micropropagation en masse en utilisant le bioréacteur (Ammirato, 1987, Novak *et al.*, 1989). En outre, les embryons somatiques constituent un matériel de base dans le concept de semences artificielles (Redenbaugh *et al.*, 1988). Un certain nombre de techniques de génie génétique disponibles pour d'autres espèces végétales pourraient être éprouvées pour le bananier: fusion de protoplastes, insertion de gènes sélectionnés dans les protoplastes par électroporation, microinjection, choc hypotonique, biobalistique, coculture d'embryons somatiques avec l'*Agrobacterium* contenant des plasmides recombinés (Nomura and Komatine, 1986b; Everett *et al.*, 1988; Murfett and Klarke, 1987; McGranaham *et al.*, 1988; Toriyama *et al.*, 1988; Vasil, 1988; Ammirato, 1989).

#### 1.1.5. SUSPENSIONS CELLULAIRES ET EMBRYOGENESE SOMATIQUE

##### 1.1.5.1. Suspensions cellulaires

Classiquement, les suspensions cellulaires sont établies en milieu liquide agité à partir d'un cal friable. Des cals ont été facilement obtenus chez un grand nombre d'espèces végétales (Dodds and Roberts, 1982). Il a été montré qu'il n'existe pas de suspensions cellulaires constituées entièrement de cellules isolées, mais d'un mélange de cellules isolées et d'aggrégats cellulaires de dimension variable (Butcher and Ingram, 1976).

Les efforts pour obtenir des suspensions cellulaires chez le bananier (*Musa* spp.) ont déjà été rapportés. Une culture cellulaire à faible croissance avait été obtenue par Mohan Ram et Steward (1964). Elle



était établie à partir d'un cal produit par le tissu immature du fruit. Des cellules pallissadiques avaient été également isolées enzymatiquement par Cronauer et Krikorian (1986) à partir des feuilles matures de bananier. Cependant, dans les deux cas précités, les cultures cellulaires étaient non morphogénétiques.

Des cultures de suspensions cellulaires ont été plus récemment établies avec succès par Novak *et al.* (1989). Ceux-ci ont obtenu des suspensions cellulaires à partir de cals produits par des explants de rhizome et de base de feuilles chez des bananiers diploïdes et triploïdes. Leur régénération en plantules a été possible. Des cultures de suspensions ont aussi été possible à partir des explants de bourgeons méristématiques en prolifération chez un bananier du groupe ABB dont il sera aussi question dans ce travail (Dhed'a *et al.*, 1989; 1991). Des suspensions cellulaires ont également été établies plus récemment encore à partir de cals obtenus sur des embryons zygotiques immatures de *Musa acuminata* (Maroquin *et al.*, soumis pour publication). Les suspensions cellulaires rapportés ci-dessus ont été capables de régénérer des plantes.

#### 1.1.5.2. Embryogénèse somatique

La capacité qu'ont les végétaux supérieurs à produire des embryons à partir du développement de l'ovule fécondé est l'embryogénèse zygotique. En culture *in vitro*, l'embryon zygotique peut présenter des différences morphologiques dues aux conditions du milieu (Fig. 6). Un phénomène semblable à l'embryogénèse peut être induit en culture de tissu et est appelé embryogénèse somatique. Dans ce processus, certaines cellules somatiques, sous l'effet des auxines, en particulier du

2,4-D, entrent en divisions ordonnées en suivant un modèle presque identique à celui de l'embryogénèse zygotique (Fig. 7) avec comme principaux stades successifs, le stade unicellulaire, globulaire, cordiforme et stade en forme de torpille ou cotylédonnaire (Fig. 8) (Esau, 1977; Johri, 1984; Zrýd, 1988).

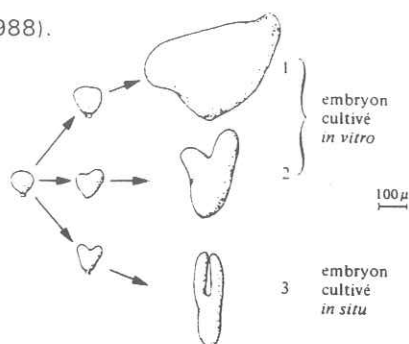


Fig. 6. Evolution d'un embryon zygotique globulaire d'une dicotylédone dans diverses conditions de culture (Zrýd, 1988)

1. embryon cultivé sur un milieu contenant la solution de Knop
2. embryon cultivé sur un milieu adapté à la culture de l'embryon
3. embryon se développant *in situ*)

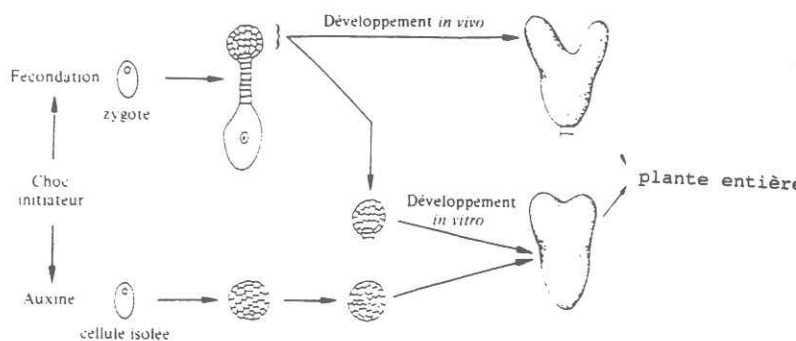
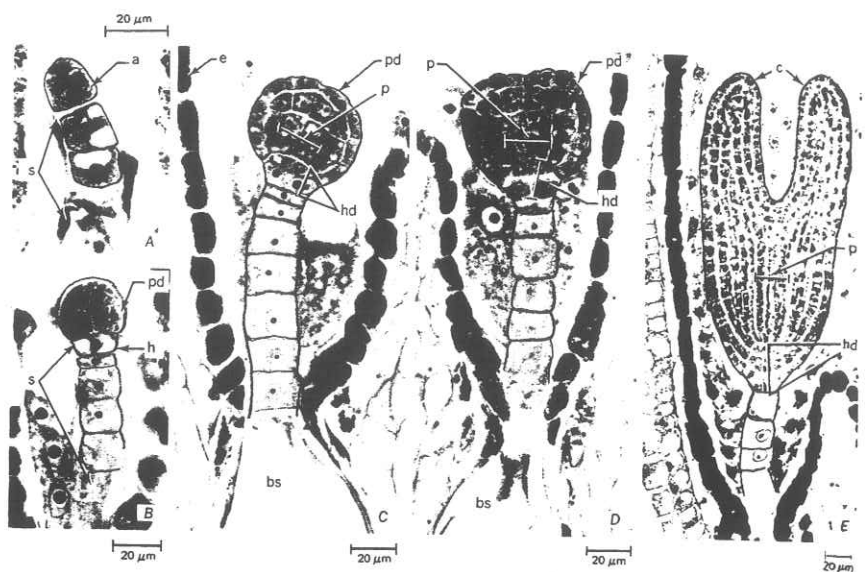
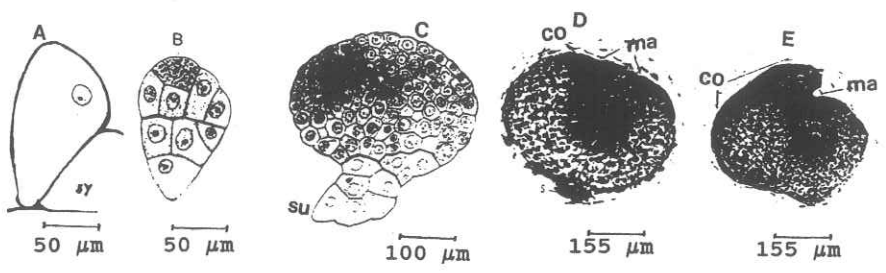


Fig. 7. Comparaison entre l'embryogénèse zygotique et l'embryogénèse somatique chez une dicotylédone (Zrýd, 1988)



**Fig. 8a.** Différents stades du développement de l'embryon zygotique chez une dicotylédone (*Capsella bursa-pastoris*) (Esau, 1977)

A: stade unicellulaire; B: stade globulaire jeune; C: stade globulaire avancé avec protoderme; D: stade cordiforme; E: stade en forme de torpille (cotylédonnaire).  
 a: cellule proembryonnaire; bs: cellule basale du suspenseur; c: cotylédons; h: hypophyse; hd: dérivé de l'hypophyse; p: procambium; pd: protoderme; s: suspenseur



**Fig. 8b.** Différents stades du développement de l'embryon zygotique chez un monocotylédone (*Cocos nucifera*) (Haccius and Philip, 1979)

A: stade unicellulaire; B: stade globulaire jeune; C: stade globulaire avancé avec protoderme; D: stade cordiforme; E: stade cotylédonnaire.  
 ma: méristème apical; co: cotylédon; su: suspenseur; sy synergide

L'embryogénèse somatique a été observé pour la première fois chez la carotte (*Daucus carota*) par Steward *et al.* (1958). La figure 8 donne schématiquement les principaux stades du développement des embryons zygotiques chez les mono- et dicotylédones. Ce phénomène assez répandu et plus étudié chez les dicotylédones (Dodds and Roberts, 1982) n'a été jusqu'à présent obtenu que chez quelques monocotylédones dont les graminées (Vasil et Vasil, 1981, 1982, 1986.) et chez les palmiers (Tisserat and Mason, 1980; Schwendiman *et al.*, 1988).

Chez le bananier, les premières études sur l'embryogénèse zygotique ont été réalisées par Gatin (1908) et White (1928). Les travaux sur le développement *in vivo* de l'ovule fécondé chez *Musa acuminata* ont été effectués par Bouharmont (1963). Les études du développement *in vitro* de l'embryon isolé de *Musa balbisiana* ont été effectuées par Afele (1986) et celles de *Musa acuminata*, par Escalant et Teisson (1987).

Plusieurs auteurs ont publié les résultats des travaux effectués pour produire des embryons somatiques à partir des tissus végétatifs (Cronauer and Krikorian, 1983, 1986, 1987; Bakry et Rossignol, 1985; Jarret *et al.*, 1985) et des tissus inflorentiels du bananier (Bakry *et al.*, 1985; Srinavasa *et al.*, 1985; Harran, 1991). Dans certains cas, des plantes ont été formées par néoformations des bourgeons à partir de cals, dans d'autres des embryons atypiques au milieu de nombreuses anomalies ont été enregistrés.

Au laboratoire de la K.U.Leuven, les premières études sur l'embryogénèse somatique ont été effectuées par Banerjee *et al.* (1987) chez cv. Bluggoe (groupe ABB). Dans ces études, des explants prélevés

sur les bourgeons méristématiques en prolifération cultivés sur un milieu enrichi en 2,4-D produisaient des nombreuses masses blanches qui évoluaient en embryons somatiques. Mais, ces derniers n'avaient pu régénérer des plantes. Les mêmes types d'explants ont été utilisés pour produire des structures globulaires ressemblant aux proembryons (stades précoces d'embryons) (Sannasgala et al., 1987; Sannasgala, 1989). En milieu liquide, ces structures régénéraient surtout des racines, mais quelques fois, des embryons somatiques et des plantules étaient aussi obtenus.

Des embryons somatiques adventifs typiques ont été obtenus par Escalant et Teisson (1988, 1989) chez les espèces sauvages *Musa balbisiana* et *M. acuminata* à partir des embryons zygotiques immatures. Des embryons somatiques en cultures de suspensions cellulaires ont été rapportés par Novak *et al.* (1989), Dhed'a *et al.* (1991) et Maroquin *et al.* (soumis pour publication) chez des bananiers diploïdes et triploïdes.

## 1.2. BUTS ET INTERET DU TRAVAIL

Ce travail est une contribution à la mise au point de la culture de suspensions cellulaires embryogéniques et de la régénération en plantules chez le bananier et bananier plantain par embryogénèse somatique à partir de tissu somatique. Il comporte:

- la mise au point de la culture de suspensions cellulaires chez *Musa* ABB, cv. Bluggoe,
- les études morphologiques et histologiques de l'embryogénèse somatique en culture de suspensions cellulaires,
- les essais d'initiation de suspensions cellulaires chez d'autres variétés

-les essais d'optimisation de la préparation de l'explant pour l'initiation de suspensions embryogéniques.

L'intérêt de ce travail réside dans le fait que les suspensions cellulaires embryogéniques constituent un matériel de choix pour:

- l'obtention de cellules et protoplastes, bases de l'amélioration génétique par les méthodes biotechnologiques,
- la micropropagation du bananier en utilisant le bioréacteur,
- la cryoconservation du germoplasme du bananier (Panis *et al.*, 1990; Panis, 1991; Panis *et al.*, 1991 a,b, ),
- le développement du concept de semences artificielles chez le bananier,
- les études biochimiques et physiologiques.

De plus, une méthode permettant de produire des suspensions cellulaires embryogéniques à partir d'un tissu somatique est d'un grand intérêt, parce qu'elle serait applicable à tous les bananiers, la plupart d'entr'eux ne produisant pas de graines, par rapport à l'utilisation d'un tissu zygotique (Escalant and Teisson, 1989; Maroquin et al., soumis) limitée aux seuls bananiers à graines (bananiers sauvages).

## CHAPITRE II. MISE AU POINT DE LA CULTURE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EMBRYOGENIQUES CHEZ CV. BLUGGOE (*MUSA ABB*)

Dans ce chapitre seront présentés la mise en culture *in vitro* du bananier, l'initiation, la maintenance, la régénération des suspensions cellulaires embryogéniques et la variation somaclonale chez les plantes issues de l'embryogénèse somatique en culture de suspensions cellulaires. Le schéma global de la procédure de culture qui sera décrite dans ce chapitre est présenté à la figure 39, le type du milieu et le temps requis pour la culture sont présentés au tableau 4.

### 2.1. LA MISE EN CULTURE *IN VITRO* DU BANANIER

#### 2.1.1. Introduction

Dans les paragraphes suivants nous décrirons les méthodes générales de cultures *in vitro* du bananier, basées sur les techniques décrites par Banerjee et De Langhe (1985), Banerjee *et al.* (1986) et Vuylsteke (1989): milieux de culture de base, mise en culture *in vitro* de l'apex caulinaire (apex méristématique) pour la culture de prolifération, conservation du stock de culture. Cette étape est importante car, la culture de prolifération servira de matériel de départ pour l'initiation de suspensions cellulaires chez le bananier et chez le bananier plantain.

#### 2.1.2. Préparation du milieu de base.

Le milieu de base est constitué des sels minéraux de Murashige et Skoog (1962). Il est additionné de 2 mg/l de glycine, de 0,5 mg/l de thiamine, de

0,5 mg/l d'acide nicotinique, de 0,4 mg/l de pyridoxine, de 10 mg/l d'acide ascorbique et de 30 g/l de saccharose. La composition détaillée de ce milieu telle que modifiée pour la culture *in vitro* du bananier à la K.U.Leuven est présentée au tableau 1.

Tableau 1. Composition du milieu de Murashige et Skoog modifié pour la culture *in vitro* du bananier tel qu'utilisé à la K.U.Leuven.

Composants		Concentration	
		mg/l	$\mu$ M/l
Macroéléments	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20630
	KNO <sub>3</sub>	1900	18810
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	2990
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	1500
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400	2970
Microéléments	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,18	100
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,90	100
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	30
	KI	0,83	5
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,24	1
	CoCl <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,024	0,1
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
Fer	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80	100
	Na <sub>2</sub> .EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,22	100
Vitamines	Glycine	2,0	26,6
	Thiamine-HCl	0,1	0,30
	Ac. nicotinique	0,5	4,06
	Pyridoxine-HCl	0,5	2,43
Anti-oxydant	Acide ascorbique	10,0	56,78
Source de carbone	Saccharose	30000	87642
Solidifiant	Agar ou gelrite	5000	-
		1750	-
Régulateurs de croissance	AIA	0,225	1
	BAP:		
	-prolifération	2,250	10
	-régénération	0,225	1



L'acide ascorbique est ajouté pour la réduction du noircissement causé par l'oxydation enzymatique des composés phénoliques (Palmer, 1963). MS désigne le milieu de base et 1/2 MS, la réduction de moitié de sa concentration en macroéléments et en fer. Les autres composants (régulateurs de croissance) seront signalés chaque fois qu'ils seront ajoutés au milieu. Pour la culture *in vitro* de l'apex caulinaire, on utilise un milieu semi-solide, généralement solidifié à l'aide 5 g/l d'agar-agar ou 2 g/l de gelrite. Le pH est ajusté avant l'autoclavage à  $5,8 \pm 0,1$  avec 1 N NaOH ou 1 N HCl.

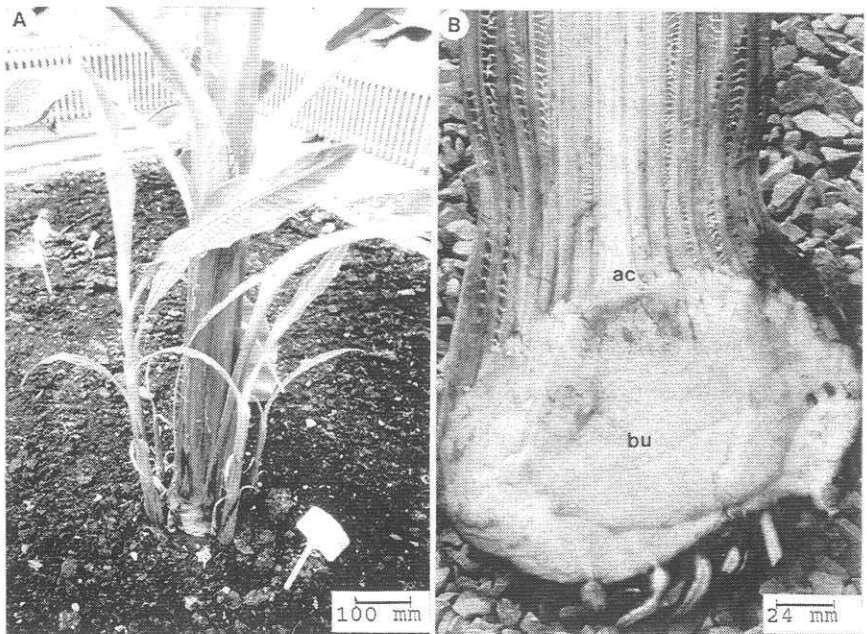
#### 2.1.3. Mise en culture *in vitro*

Le matériel utilisé est l'apex caulinaire (méristème apical). Il est prélevé sur une plante récolté *in situ* (Fig.9, 10A). Il est ensuite introduit dans un tube à essai contenant le milieu MS semi-solide additionné de  $1 \mu\text{M}$  AIA et  $10 \mu\text{M}$  BAP. L'incubation se fait sous éclairage continu de  $5,6 \text{ W/m}^2$  d'irradiance (2000 lux) fourni par des tubes fluorescents (Osram cool white), à  $28 \pm 2$  °C et à 80 % d'humidité relative. En cas de noircissement important, l'apex est transféré après 2 semaines sur du milieu frais. Les bourgeons à prolifération sont subcultivés lorsque les bourgeons recouvrent 2/3 de la surface du milieu (10 semaines)(Fig.10B). Cette culture de prolifération peut servir pour la régénération ou la conservation du stock de culture.

#### 2.1.4. Maintenance du stock de culture

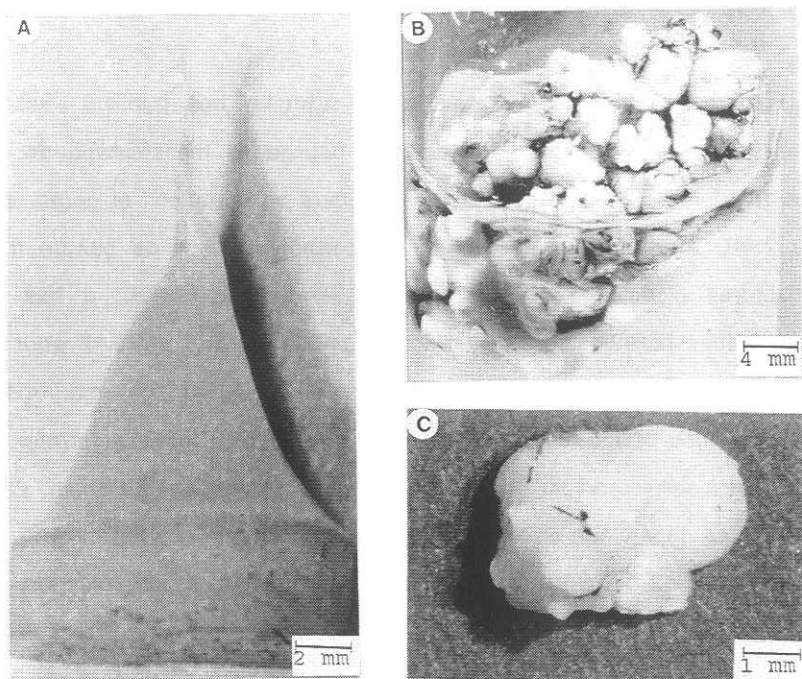
La maintenance du stock de culture peut être assurée par un repiquage régulier d'une culture de prolifération sur du milieu frais. Ce mode de maintenance impliquant des subcultures fréquentes a le désavantage d'être laborieux et de conduire à la production de variants somaclonaux, sans

oublier le risque toujours présent de contamination. C'est pourquoi, le matériel non requis pour un travail immédiat peut être conservé dans des conditions de croissance lente en chambre froide à 15 °C sous un éclairage de 2.8 W/m<sup>2</sup> (1000 lux). Le séjour dans la chambre froide peut durer entre 13-17 mois (Banerjee *et al.*, 1985). Pour être réutilisé, un matériel issu de la chambre froide est repiqué sur du milieu frais après une semaine d'acclimatation dans la chambre de culture.



**Fig. 9.** Matériel de départ pour la culture *in vitro* du bananier

- A.** Plante mère d'un bananier *in situ* avec ses rejets.  
**B.** Coupe longitudinale du pseudo-tronc montrant la position de l'apex caulinaire.  
 ac: apex caulinaire; bu: bulbe.



**Fig. 10.** Initiation de la culture *in vitro* de prolifération de bourgeons méristématiques.

- A.** Apex caulinaire.
- B.** Culture de prolifération avec bourgeons multiples.
- C.** Explant (scalp) prélevé sur les bourgeons multiples.

## 2.2. INITIATION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EMBRYOGENIQUES

### 2.2.1. Introduction

Des travaux antérieurs (Banerjee et De Langhe, non publiés) avaient montré que les explants, obtenus des bourgeons méristématiques en prolifération (scalps), placés en milieu liquide en agitation et contenant du 2,4-D et BAP libéraient après une certaine période de culture des structures globulaires et des cellules. Sannasgala (1989), a fixé la composition hormonale de ce milieu à 5  $\mu\text{M}$  2,4-D et 1  $\mu\text{M}$  BAP pour la production des globules blanches appelés par cet auteur "proembryons". En effet, ces structures, comme il sera discuté plus loin, se forment à partir des cellules de la région périvasculaire à l'intérieur du scalp. Ces cellules au départ non embryogéniques le deviennent sous l'effet du 2,4-D. Le rôle du 2,4-D a été par ailleurs reconnu dans la désorganisation du tissu et, en combinaison avec les cytokinines dans la division cellulaire organisée, aboutissant à la formation de ces structures. Dans ce travail, ces structures globulaires seront appelées "globules méristématiques" pour éviter de les confondre avec les autres structures vraiment proembryogéniques qui seront largement décrites au chapitre III.

### 2.2.2. Matériel et méthodes

#### 2.2.2.1. Le matériel végétal

Le matériel de cette étude a été le cultivar Bluggoe (*Musa* spp. groupe ABB). Ce cultivar, qui produit des bananes à cuire, avait été introduit à partir de la collection de The Philippines Council for Agriculture and Resources Research and Development (PCARRD), Los Baños, The

Philippines, sous le nom de Matavia (Valmayor *et al.*, 1981). Matavia est identique au Bluggoe, un bananier assez répandu et bien connu décrit par Simmonds (1966). Le cultivar Bluggoe a souvent été utilisé pour différentes études au Laboratoire de Phytotechnie Tropicale (K.U.Leuven) à cause de sa haute prolifération *in vitro*.

#### 2.2.2.2. L'explant

L'explant utilisé dans cette étude a été une pièce prélevée sur les bourgeons méristématiques en prolifération ou scalp (Fig. 10C).

Pour prélever des scalps, des apex méristématiques ont été mis en culture de prolifération *in vitro* sur 1  $\mu\text{M}$  AIA et 10  $\mu\text{M}$  BAP (Vuylsteke and De Langhe, 1985; Banerjee *et al.*, 1986). La préparation des cultures de prolifération a été décrite plus haut.

L'initiation des cultures de suspensions cellulaires a été faite en inoculant 5 scalps de 4-5 mm de diamètre dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 20 ml de milieu liquide à base de sels de Murashige et Skoog (1/2 MS) additionnés de 5  $\mu\text{M}$  2,4-D et de 1  $\mu\text{M}$  BAP. Les cultures sont placées sur des agitateurs rotatifs à  $\pm 70$  rpm, sous un éclairage continu de  $\pm 2,57 \text{ W/m}^2$  d'irradiance fourni par des tubes fluorescents Osram cool white de 36 W.

Ces expériences ont été réalisées en 4 exemplaires. Les principales observations effectuées sont les suivantes:

- comptage direct de globules libres produits par les scalps,
- estimation du nombre de cellules libres à partir de 5 semaines après l'initiation de la culture à l'aide de cellules de comptage hématimétrique

-observation à l'état frais des principales formes de cellules sous microscope photonique.

#### 2.2.2.3. Effet de quelques régulateurs de croissance

Le but était d'étudier si d'autres régulateurs de croissance pouvaient, en association avec le 2,4-D, avoir une action meilleure que BAP qui avait été utilisé auparavant (Sannasgala, *et al.*; 1987, Sannasgala, 1989).

Les régulateurs testés ont été:

-BAP (1  $\mu$ M), témoin

-CW (2,5%, 5%, et 10%): lait de noix de coco (*Cocos nucifera*)

-Kinétine (1  $\mu$ M)

-AMPc (1  $\mu$ M): Adénosine monophosphate cyclique

-zéatine (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M).

Trois expériences différentes ont été conduites à des moments différents et avec du matériel dont on a pas tenu compte du temps écoulé après la dernière subculture (l'âge de la subculture).

#### 2.2.2.4. Effet de l'âge de la subculture de prolifération

Au cours d'une culture, l'explant subit différents changements. Il a donc paru nécessaire de savoir si les scalps prélevés sur les bourgeons en prolifération à différents moments après la dernière subculture pouvaient donner les mêmes réponses quant à la production de globules méristématiques et de cellules.

Pour étudier l'effet de l'âge de la subculture, des scalps ont été prélevés après une, deux, jusqu'à six semaines après la dernière subculture de

prolifération. Les scalps ont été inoculés dans le milieu liquide dans les conditions décrites plus haut, mais avec 5% CW comme source de cytokinines. Le nombre de globules méristématiques et de cellules ont été comptés suivant ce décalage de temps.

#### 2.2.2.5. Etablissement des suspensions embryogéniques

Des essais de maintenance des cellules en cultures d'initiation avaient été tenté auparavant par Banerjee et De Langhe (non publié). Les cellules obtenues n'avaient pu être maintenues en suspensions cellulaires pures sans les explants initiaux. Ceci laissait supposer que les cellules obtenues en début d'initiation étaient directement libérées par ces explants et n'étaient pas capables de se diviser activement (cellules de réserve). En effet, ces cultures contenaient des cellules allongées très vacuolisées et des cellules ovales remplies de grosses réserves d'amidon. La question de la durée de la culture avec les explants initiaux s'est donc posée.

Pour établir des suspensions cellulaires embryogéniques, les meilleures cultures issues des différentes expériences décrites plus haut ont été utilisées. Elles comprenaient 20 erlenmeyers au total dont 8 initiés en 5% CW, 4 en 10% CW et 8 en 1  $\mu$ M zéatine. Ces nombres étaient obtenus après des dilutions des cultures de départ. Les cultures étaient rafraîchies avec le milieu contenant 1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 1  $\mu$ M zéatine. Au début, presque tout le vieux milieu était déversé après une légère décantation et était remplacé par du milieu frais après 2-3 semaines. Par après, lorsque la densité de la culture devenait grande (culture visqueuse), celle-ci était diluée 2 ou 3 fois et répartie dans différents erlenmeyers. Ceci entraînait progressivement la réduction du nombre de scalps et de globules par erlenmeyer. Après 3 mois de cultures, on

pouvait enlever complètement les scalps après avoir décroché au préalable au moyen d'une pincette les globules encore collés à leur surface. Les cultures où les agrégats cellulaires devenaient apparents étaient débarrassées du reste de globules par filtration à travers un tamis (0,5-1 mm de mailles). Ces cultures passaient dans la phase de maintenance.

### 2.2.3. Résultats et discussion

#### 2.2.3.1. Initiation de suspensions

Les explants introduits en milieu liquide perdent leur organisation comme bourgeons multiples et leur épiderme. Après 3 à 4 semaines, des structures globulaires blanches apparaissent dans le milieu. Un examen microscopique révèle dans la culture la présence de deux types de cellules libres: les cellules allongées (200-250  $\mu\text{m}$  de longueur) très vacuolisées et les cellules ovales (75-100  $\mu\text{m}$  de longueur) remplies de grosses granulations d'amidon. A ce stade on ne voit pas encore des cellules avec des caractéristiques embryogéniques dans la culture.

#### 2.2.3.2. Effet de quelques régulateurs de croissance

Les résultats concernant ces observations sont résumés par les figures 11 à 14. Elles présentent les nombres totaux de globules méristématiques et de cellules allongées et ovales sous l'effet des différents régulateurs après 8 semaines d'initiation de la culture (Fig. 11 à 13) et l'évolution du nombre de globules et de cellules entre la 5<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> semaines (Fig. 14).



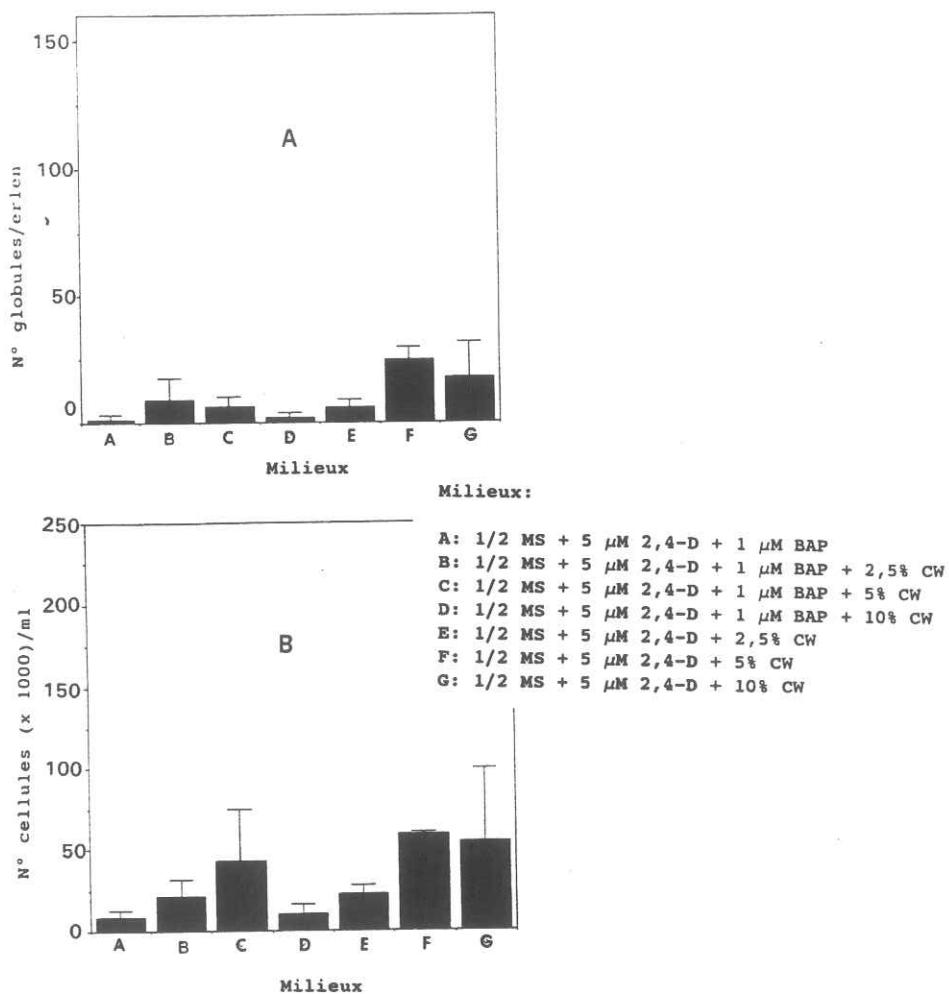


Fig. 11. Nombre total de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) en présence de BAP et de lait de coco 8 semaines après inoculation des scalps

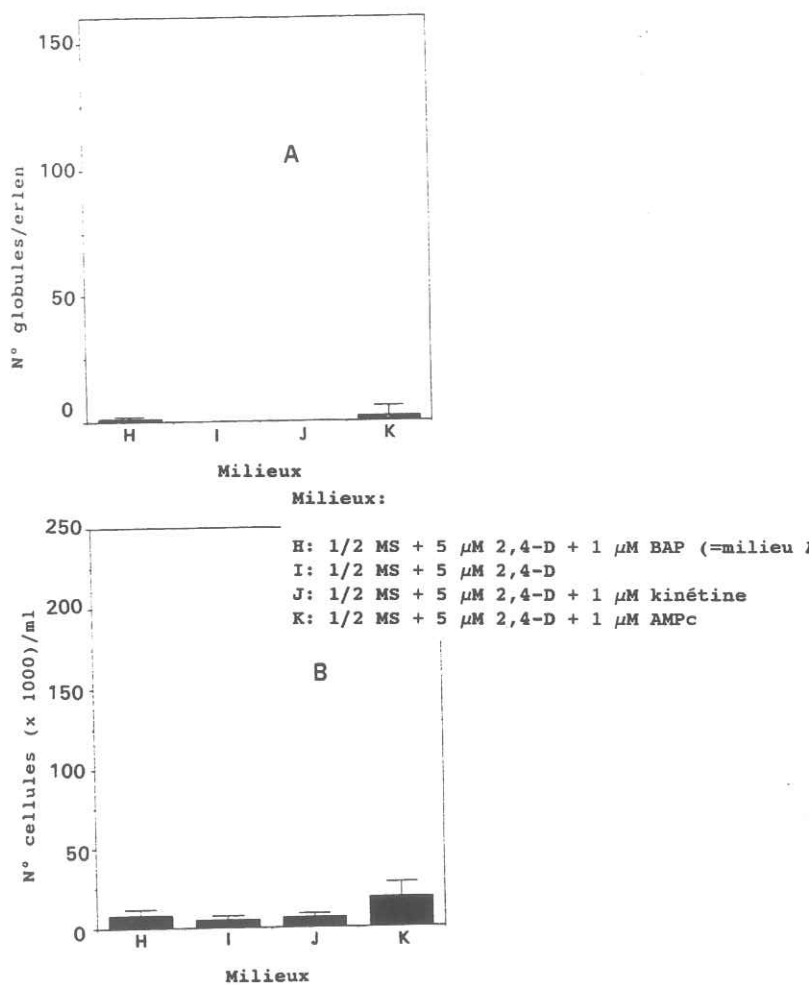


Fig. 12. Nombre total de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) en présence de BAP, kinétine et cAMP 8 semaines après inoculation des scalp

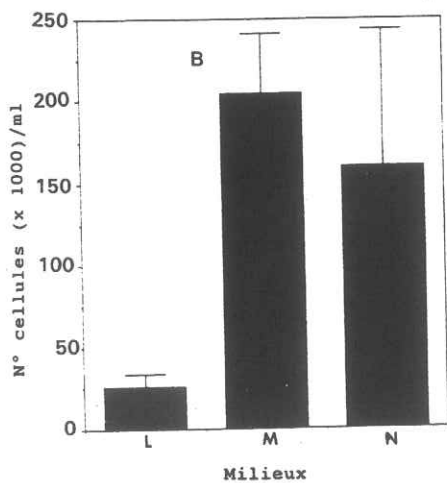
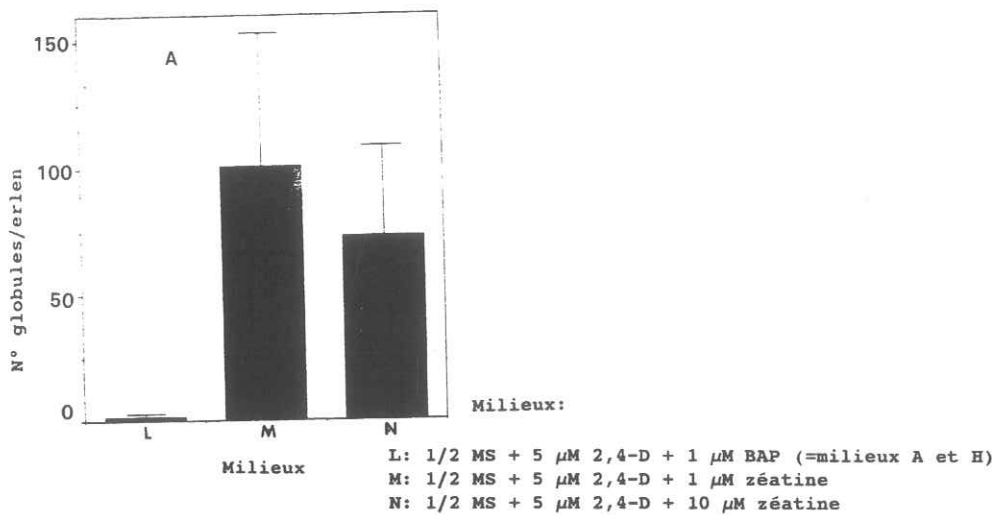


Fig. 13. Nombre total de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) en présence de BAP et zéatine 8 semaines après inoculation des scalps

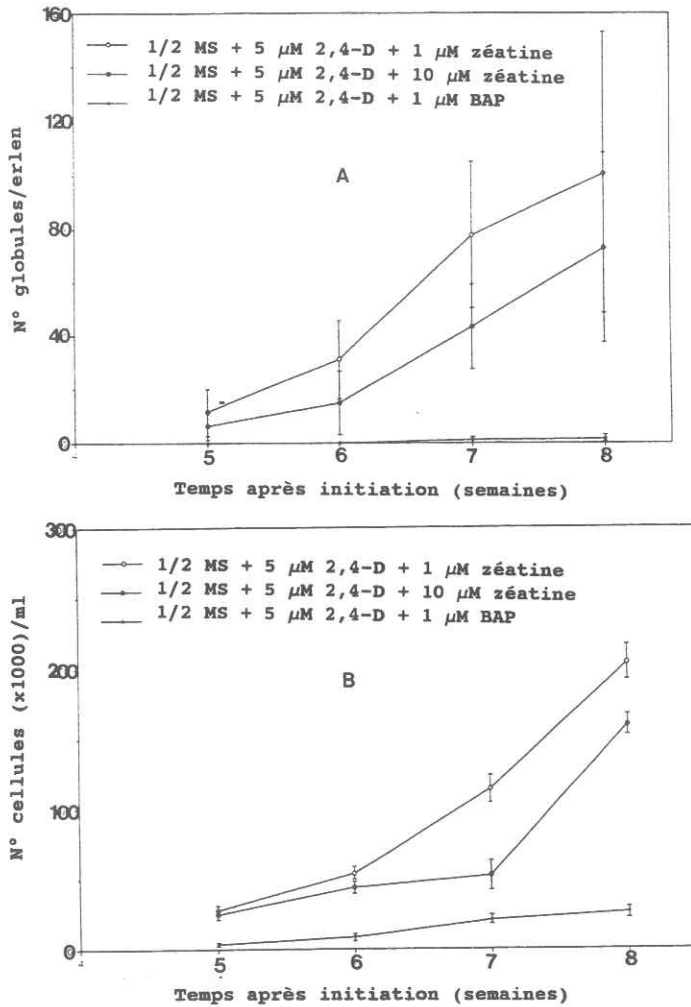


Fig. 14. Evolution du nombre de globules méristématiques (A) et de cellules libres (B) sous l'effet de BAP et de zéatine.

Il ressort des ces figures une action marquée de la zéatine (Fig.13) tant sur la production de globules méristématiques que sur celle de cellules pour cette durée de culture. La zéatine est suivie par le lait de la noix de coco (CW) à 5-10% (Fig. 11). L'analyse de variance (GLM, test de Duncan, voir annexes 1 et 2) montre qu'il existe des différences significatives (au seuil de 5%) entre le nombre de cellules pour ces traitements. Pour la production de globules, le BAP, en combinaison avec le lait de coco a un effet défavorable sur la quantité de globules.

Le BAP est une cytokinine synthétique, tandis que la zéatine est une cytokinine naturelle extraite de certaines monocotylédones, ayant a une grande activité biologique (George and Sherrington, 1984). L'action du lait de coco se justifie par sa teneur élevée en zéatine, en particulier. Le lait de coco est souvent utilisé dans la culture de suspensions cellulaires à des concentrations variées, généralement à 10%, en remplacement des cytokinines synthétiques, (Ammirato, 1984). C'est une substance complexe contenant, en outre, du myoinositol, des acides aminés, des acides nucléiques, des vitamines et des sucres. Il a été essentiel, à la concentration de 20%, dans l'embryogénèse somatique chez le manguier (*Mangifera indica*) (De Wald, 1989).

L'ensemble de résultats illustrés par les figures 11 à 14 montre une corrélation positive entre le nombre de globules méristématiques et celui de cellules comme le montre la figure 15, laquelle est en accord avec la figure 14 montrant l'évolution du nombre total de globules et de cellules entre 5 et 8 semaines après initiation des cultures.

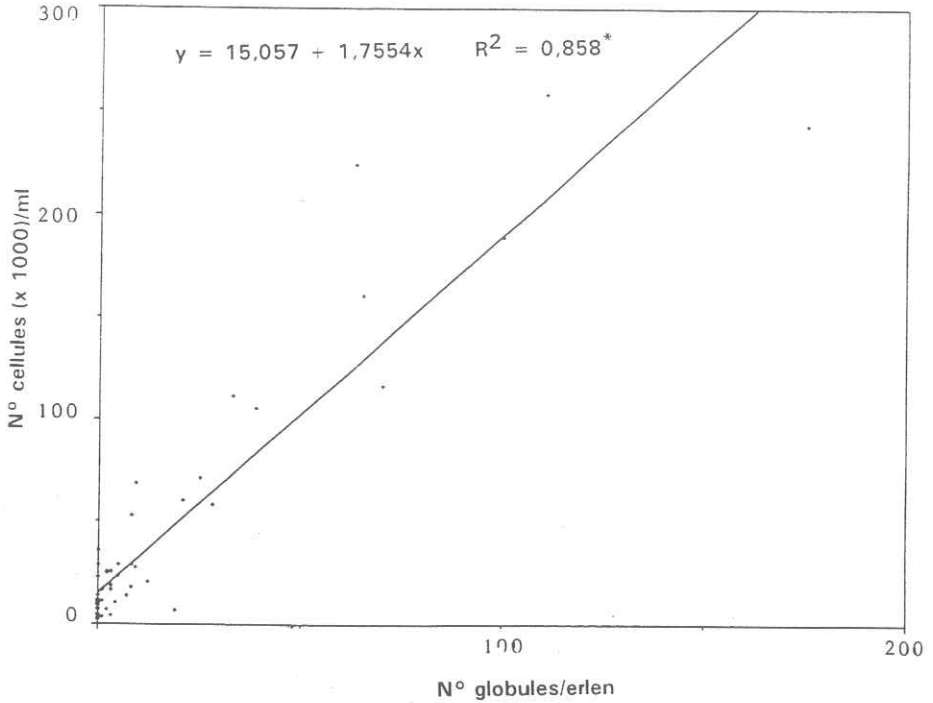


Fig. 15. Nombre de cellules totales (ovales+allongées) en fonction du nombre de globules 8 semaines après initiation pour des traitements différents

L'évolution quantitative des 2 principaux types de cellules que l'on rencontre au cours de cette période d'initiation (4-7 semaines) est illustrée par la figure 16. Les cellules allongées vacuolisées diminuent en nombre pendant qu'augmentent les cellules ovales remplies de grosses réserves d'amidon. Comme le nombre de cellules allongées vacuolisées diminue avec le temps pendant qu'augmente celui de cellules ovales, la corrélation positive est due apparemment au nombre de cellules ovales seules. Il est donc probable que les globules méristématiques soient les

principales sources de cellules ovales riches en réserve d'amidon. En effet, les observations effectuées montrent que les globules méristématiques comportent une importante zone de cellules ovales remplies d'amidon (voir plus loin). Ces cellules sont lâches vers la surface. Les cellules allongées qui disparaissent seraient produites par les scalps. Le détail histologique d'un globule méristématique sera décrit au chapitre III. Les cultures ne contenant que ces 2 types de cellules libres n'ont pu être maintenues sans les explants initiaux, les globules méristématiques.

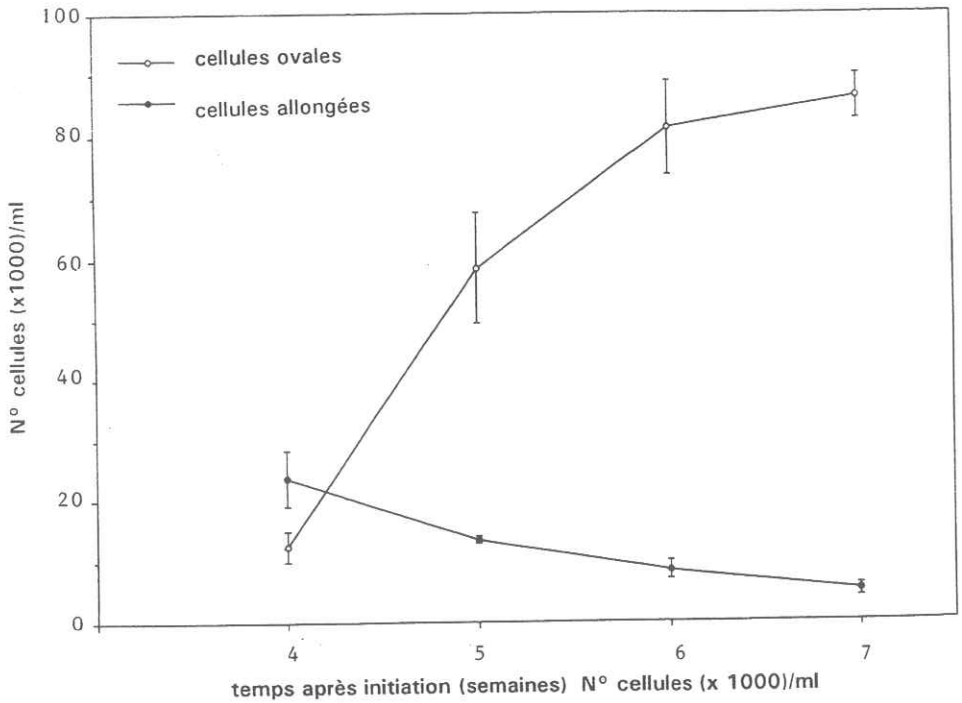


Fig. 16. Evolution du nombre de cellules ovales et allongées après initiation de suspension (un rafraîchissement du milieu a été fait à 4 semaines après initiation). (Milieu: 1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 1  $\mu$ M zéatine)

### 2.2.3.3. Effet de l'âge de la subculture de prolifération

Le nombre total de globules méristématiques et de cellules suivant ce décalage de temps (en semaines) est illustré par la figure 17.

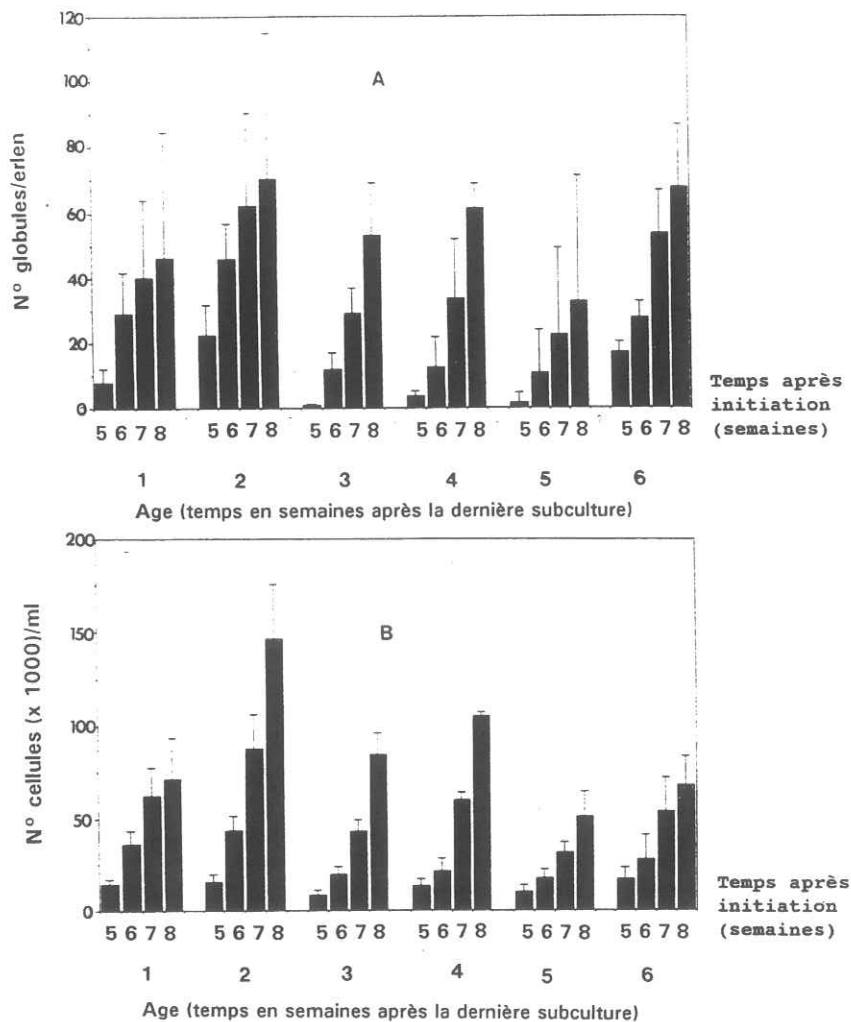


Fig. 17. Evolution du nombre total de globules méristématiques (A) et de cellules libres suivant l'âge de la subculture de prolifération à l'origine de l'explant au début de l'initiation. (Milieu d'initiation: 1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 5% CW).



La figure 17 montre une hausse plus prononcée de ce nombre quand les scalps ont été prélevés après 2 semaines. La tendance est à la baisse lors qu'on attend plus longtemps. L'analyse de variance (GLM, test de Duncan, voir annexes 3 et 4) a montré que, d'une manière générale, l'augmentation du nombre de cellules et de globules est significative entre 5, 6 et 7 semaines après initiation. Les observations effectuées montrent qu'à 2 semaines la prolifération des bourgeons est telle qu'il est facile de prélever des scalps de bonne qualité. Plus tard, les parties vertes deviennent plus abondantes, ce qui entraîne un noircissement plus important.

Ces expériences conduites avec le lait de coco (5% CW) ont aussi donné des résultats satisfaisants au cours de cette phase d'initiation.

#### 2.2.3.4. L'établissement des suspensions cellulaires embryogéniques

Les observations effectuées ont montré qu'après plusieurs rafraîchissements de 2-3 semaines avec les mêmes milieux, les cultures, dans les meilleurs des cas augmentent en densité en cellules totales en 3-4 semaines. Sur un total de 20 lots de culture, 13 (soit 65%) ont abouti à des cultures renfermant des petits groupes cellulaires (Fig. 18A) (en moyenne 2 à 20 cellules par groupe) après une période de 4 à 6 mois. Après 2 à 3 subcultures de 3-4 semaines, ces groupes augmentent en nombre et en grandeur. Les cellules qui contiennent ces groupes sont petites, intimement liées, au cytoplasme très dense et sont très brillantes avec le FDA (Widholm, 1972) sous microscope à fluorescence (Fig. 18B). Ces groupes ressemblent aux masses embryogéniques telles que décrits dans les travaux sur l'embryogénèse somatique chez *Daucus carota*, *Panicum maximum* et *Pennisetum americanum* (McWilliam *et al.*, 1974;

Lu and Vasil, 1981; Vasil and Vasil, 1981, 1982; Williams and Maheswaran, 1986; De Vries *et al.*, 1988). Une culture riche en groupes embryogéniques constitue une suspension établie et peut être débarassée du reste de globules initiaux pour entrer dans la phase de maintenance (Fig. 18C).

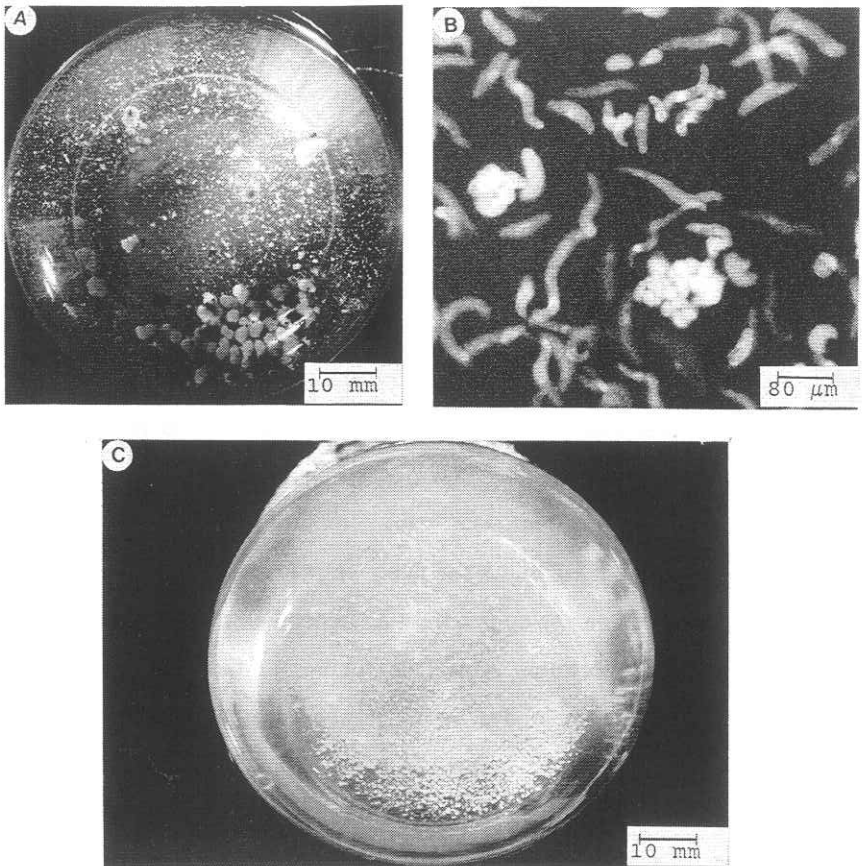


Fig. 18. Culture d'initiation de suspensions cellulaires embryogéniques

- A. Culture avancée au stade de globules méristématiques (grandes masses blanches en bas) produisant des groupes embryogéniques (très petites granulations blanches).
- B. Vue microscopique sous fluorescence (FDA) montrant des petits groupes cellulaires très fluorescents (groupes embryogéniques) et des cellules allongées non embryogéniques.
- C. Une suspension cellulaire embryogénique établie en culture de maintenance.

La nature de l'explant, la présence du 2,4-D, le type et la concentration de cytokinine et la durée de la culture apparaissent comme étant des facteurs les plus importants pour l'initiation de suspensions cellulaires embryogéniques.

Le rôle du 2,4-D dans l'induction du potentiel embryogénique est bien connu (Ammirato, 1983). Par contre, le mécanisme moléculaire de cette induction n'est pas connu (De Vries *et al.*, 1988). La concentration à laquelle il a été utilisé varie suivant les espèces: 1-2,5 mg/l (soit environ 5-12,5  $\mu\text{M}$ ) chez les graminées (Vasil, 1984), 4,5  $\mu\text{M}$  chez *Daucus carota* (Ammirato, 1984), 80-100 mg/l (soit environ 400-500  $\mu\text{M}$ ) chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis*) (De Touchet *et al.*, 1991).

Nomura et Komatine (1985) ont démontré que des cellules en suspensions, morphologiquement distinctes, sont capables de se développer en masses proembryoniques en présence du 2,4-D. Cependant, il n'est pas encore clair si ces cellules dérivent d'un précurseur commun préexistant dans l'explant ou se forme *de novo* à partir des cellules non embryogéniques (De Vries *et al.*, 1988).

En effet, la résolution des observations conflictuelles quant à l'origine des embryons somatiques a été grandement assistée par les hypothèses avancées par Sharp *et al.* (1980, 1982), Evans *et al.* (1981). Ces hypothèses suggèrent que l'embryogénèse somatique directe procède des cellules déjà déterminées au développement embryogénique dans l'explant initial appelées "pre-embryogenic determined cells" (PEDC). C'est le cas des cellules des tissus embryonnaires (épiderme de l'hypocotyle d'embryon, nucelle, synergide...). Ces cellules requièrent seulement les régulateurs de croissance ou des conditions favorables

pour l'expression de l'embryogénèse (Williams and Maheswaran, 1986). Par contre, l'embryogénèse somatique indirecte (l'embryogénèse somatique à partir d'un cal, d'une suspension cellulaire) requiert une redétermination de cellules différenciées. On parle ici de "induced embryogenically determined cells" (IEDC) (Tisserat *et al.*, 1979). Dans ce dernier cas, les régulateurs de croissance sont nécessaires non seulement pour la reprise de la mitose, mais aussi pour la détermination de l'état embryogénique (Williams and Maheswaran, 1986). Les suspensions cellulaires à potentiel embryogénique chez *Daucus carota* renferment invariablement des masses proembryogéniques (proembryogenic masses ou PEM) (Halperin, 1966; Halperin and Jensen, 1967), ce qui est aussi le cas des suspensions établies chez le bananier telles qu'il est décrit plus haut.

Aussi, l'établissement d'une bonne suspension cellulaire chez *Musa ABB*, cv. Bluggoe a nécessité une longue période de temps (16-24 semaines) en présence de scalps et/ou globules méristématiques, du 2,4-D, de zéatine ou du lait de coco. Les explants doivent être enlevés graduellement: les scalps d'abord, et les globules méristématiques, une fois que la suspension est bien établie. De Vries *et al.* (1988) ont montré l'importance du maintien des explants initiaux au début de l'initiation chez *Daucus carota*. Le retrait du cal de l'hypocotyl avant 14 jours résultait dans l'obtention d'une suspension à faible potentiel embryogénique. L'utilisation d'un milieu préconditionné avec les extraits d'une suspension déjà établie résolvait ce problème. Ces extraits contenaient des substances thermolabiles de poids moléculaire élevé qui favorisaient l'acquisition du potentiel embryogénique (De Vries *et al.*, 1988).

#### 2.2.4. Conclusions

De l'ensemble de ces expériences, il ressort, pour le cultivar étudié, ce qui suit:

- les scalps constituent un bon matériel pour l'initiation des suspensions cellulaires embryogéniques,
- les meilleurs scalps sont ceux prélevés 2 semaines après la dernière subculture sur un milieu MS à 1  $\mu$ M AIA et 10  $\mu$ M BAP,
- la zéatine a été la meilleure pour la production des globules méristématiques et des cellules,
- le lait de coco peut être utilisé comme milieu complexe à 5-10% dans l'initiation de suspensions,
- les premiers globules qui sont produits entre 3-4 semaines sont à l'origine des cellules ovales remplies des grosses granulations d'amidon,
- l'établissement d'une culture de suspensions embryogéniques nécessite une longue période de temps (6 mois) dans le milieu d'initiation avec les explants initiaux jusqu'à l'apparition des agrégats cellulaires (groupes embryogéniques) avec un renouvellement du milieu toutes les 2 à 3 semaines,
- les scalps peuvent être enlevés après les 3 premiers mois de l'initiation, mais les globules peuvent l'être, une fois que la culture renferme des nombreux agrégats cellulaires embryogéniques.
- Le 2,4-D est essentiel pour l'initiation de suspensions embryogéniques.

## 2.3. MAINTENANCE DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EMBRYOGENIQUES

### 2.3.1 Introduction

- La maintenance d'une suspension est la culture d'une suspension établie en phase active de croissance grâce aux subcultures régulières. Ces subcultures permettent de maintenir un stock permanent de cultures utilisables à tout moment pour l'amplification, la conservation du matériel et la régénération en plantules ou tout autre traitement ou étude. Les milieux, les intervalles de subcultures et la durée de la maintenance sont variables suivant les espèces et sont déterminés empiriquement.

### 2.3.2. Matériel et méthodes

#### 2.3.2.1. Essai de maintenance

Les premières cultures débarassées de leurs explants initiaux ont été introduites dans différents milieux dont la composition est donnée au tableau 2, ceci, afin d'observer si elles pouvaient y être maintenues en culture active. Les cultures en milieux A, B, C ont été effectuées au même moment, mais avec des cultures provenant de trois erlenmeyers différents. Un deuxième essai a été effectué avec une même culture divisée en trois par dilution et inoculée en B, D, E. Les résultats de ces 3 derniers essais ne sont présentés qu'à titre indicatif. L'évolution du nombre total de cellules libres (cellules allongées, ovales et cellules embryogéniques) et de petits groupes embryogéniques a été suivie par comptage pendant 6 semaines après la dernière dilution. La viabilité des cellules a été estimée sous microscope à fluorescence après un traitement avec la fluoescéine diacétate 1% dans l'acétone (test FDA) (Widholm, 1972).

Tableau 2. Composition des milieux essayés pour la maintenance de suspensions

N°	Proportion de sels MS	Auxines	Cytokinines
A	3/4	-	1 $\mu$ M zéatine
B	3/4	5 $\mu$ M 2,4-D	1 $\mu$ M zéatine
C	3/4	10 $\mu$ M 2,4-D	1 $\mu$ M zéatine
D	1/2	5 $\mu$ M 2,4-D	10% CW
E	3/4	5 $\mu$ M 2,4-D	5% CW

#### 2.3.2.2. Maintenance proprement dite

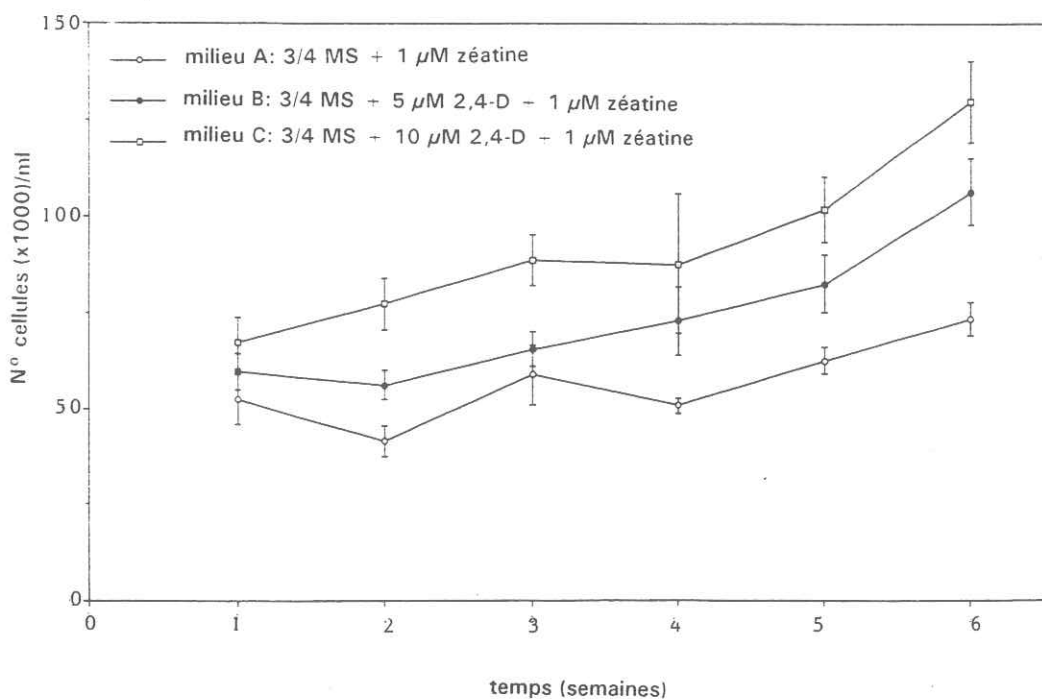
Par la suite, grâce aux résultats des essais de maintenance, la maintenance s'est faite routinièrement en diluant une suspension une ou deux fois suivant sa densité estimée visuellement avec un milieu à 1/2 MS, 5  $\mu$ M 2,4-D et 1  $\mu$ M zéatine après 3-4 semaines. La suspension à subcultiver était grossièrement filtrée à travers un tamis de 1 mm de mailles pour éliminer les gros agrégats. -

Au cours de la maintenance, l'évolution d'une suspension a été suivie du point de vue de sa population cellulaire par le comptage de nombre de cellules de formes allongées, ovales, arrondies et de groupes embryogéniques chaque semaine pendant 6 semaines. Le volume de cellules tassées après centrifugation à 1000 g pendant 5 minutes (packed cell volume) (Reinert and Yeoman, 1982) a aussi été mesuré.

### 2.3.3. Résultats et discussion

#### 2.3.3.1. Essai de maintenance

Les figures 19 à 21 montrent les nombres totaux de cellules libres, de groupes embryogéniques (petits groupes <0,5 mm de diamètre) et leur viabilité au cours de 6 semaines dans des milieux à 3/4 MS après qu'on ait débarassé les cultures des scalps et des globules par filtration. Elles montrent que, dans tous les cas, le nombre de cellules et de groupes cellulaires embryogéniques, quoique faible au début, augmente. Cette augmentation ainsi que l'aspect des suspensions sont variables suivant la composition du milieu.



**Fig. 19.** Effet du milieu de maintenance sur le nombre total de cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu



Dans le milieu A sans 2,4-D, les agrégats sont plus volumineux et la viabilité est plus élevée. Le nombre de cellules y a augmenté faiblement et en fin de culture, on y a observé de nombreuses structures racinaires, d'où l'importance du 2,4-D pour la maintenance. Dans le milieu B avec 5  $\mu\text{M}$  2,4-D, le nombre de cellules augmente aussi faiblement, les agrégats sont un peu moins volumineux et la viabilité plus faible que dans A. Dans le milieu C avec une concentration du 2,4-D double du précédent, les agrégats sont par contre plus nombreux et moins volumineux que dans A et B, la viabilité est plus faible que dans A mais supérieure à B. Le nombre de cellules y augmente plus rapidement.

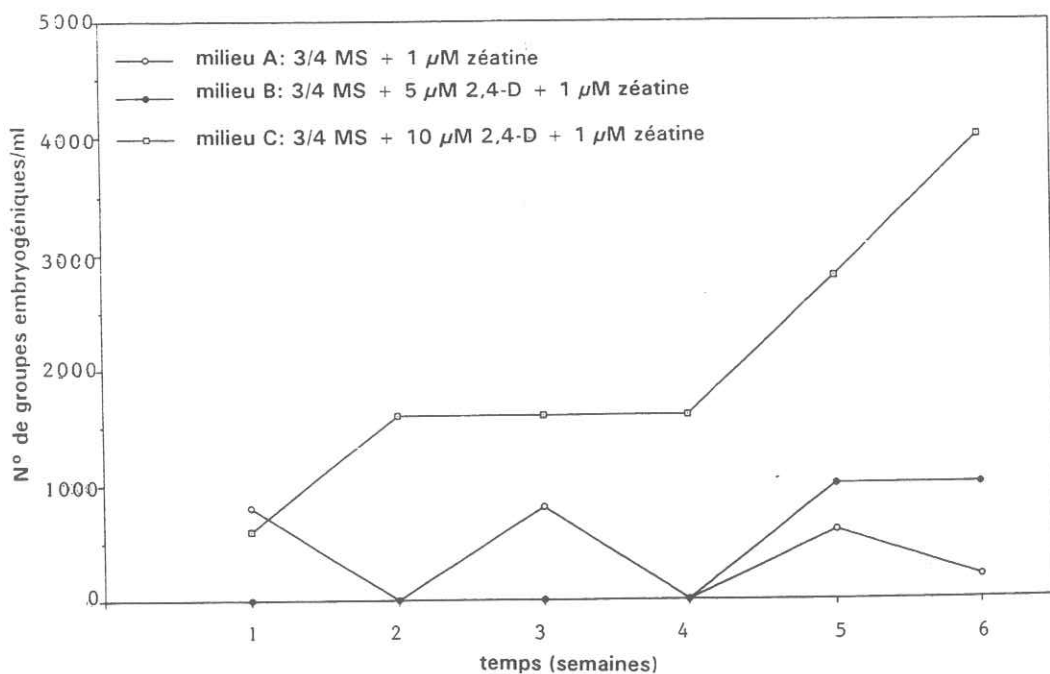


Fig. 20. Effet du milieu de maintenance sur le nombre de groupes embryogéniques ( $\phi < 0,5$  mm) après rafraîchissement et dilution du milieu

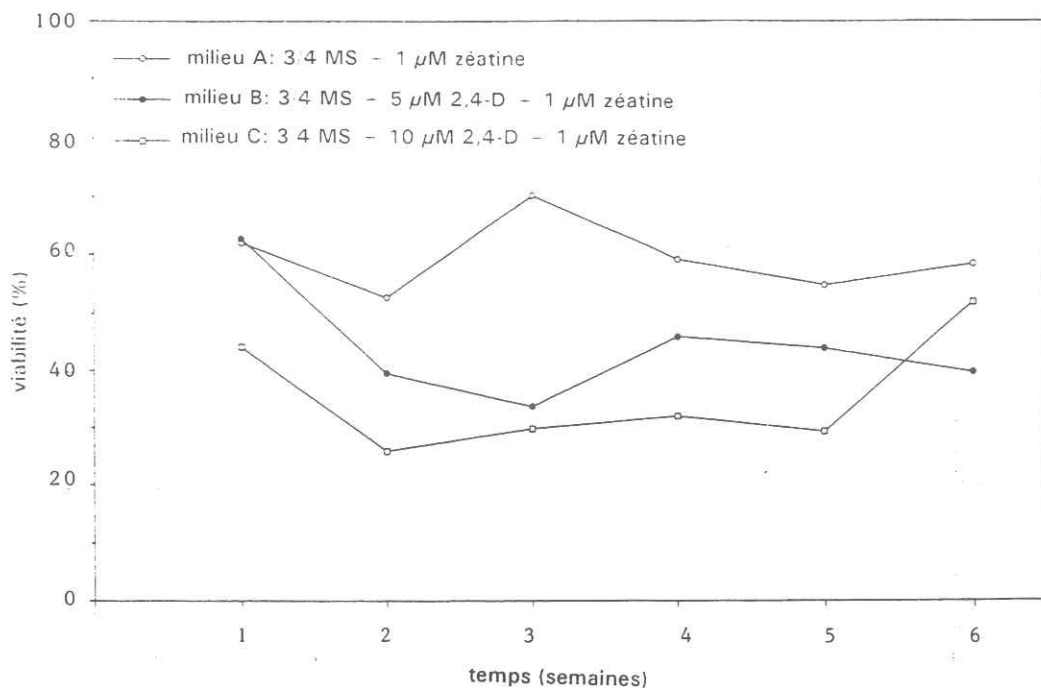


Fig. 21. Effet du milieu de maintenance sur la viabilité des cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu

En général, les groupes sont toujours plus viables par rapport aux cellules isolées. Comme le montre la figure 22, la dilution de 1/2 entre 1 et 6 semaines après la dernière subculture ne semble pas rehausser d'une manière remarquable la viabilité. Celle-ci semble plutôt variable au cours de la culture et pourrait beaucoup plus être liée au milieu et à la libération des différentes sortes de cellules par les agrégats cellulaires. Toutefois, pour une maintenance, celle-ci doit être rafraîchie et diluée à intervalles réguliers de temps. L'intervalle optimal de temps devra être établi en fonction de la densité initiale de la suspension. Ces résultats ne permettent pas une comparaison aisée des milieux utilisés, car les trois cultures ont une origine et une composition en population du départ différentes. Le milieu C avec 10  $\mu$ M 2,4-D paraît cependant le meilleur.

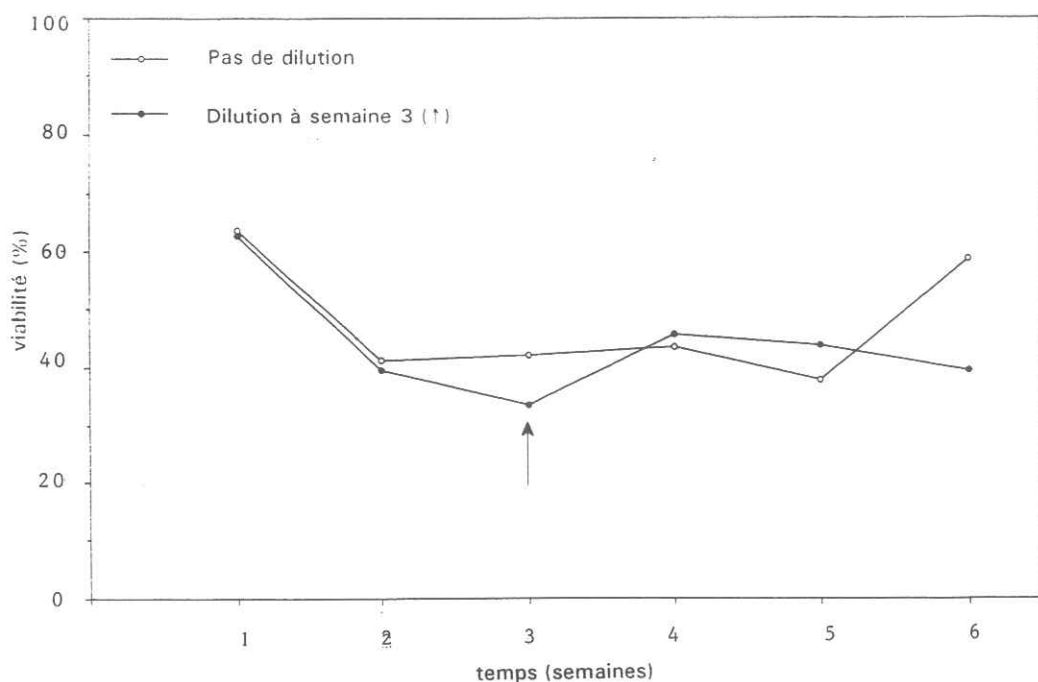


Fig. 22. Effet de dilution à la 3ème semaine sur la viabilité des cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu (milieu C = milieu C: 3/4 MS + 10  $\mu$ M 2,4-D + 1  $\mu$ M zéatine)

Les résultats reprises sur les figures 23 à 25 où la suspension d'origine était la même, montrent cette fois-ci que le milieu B (1  $\mu$ M zéatine) donne le meilleur résultat en ce qui concerne le nombre de cellules, et le milieu D (10% CW) pour les groupes et la viabilité. Ce dernier est de composition identique au milieu d'initiation (1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 5-10% CW). Il

convient de remarquer ici que les milieux D et E, renfermant du lait de noix de coco, se caractérisent par un brunissement plus prononcé du milieu par rapport au milieu B avec zéatine. Par ailleurs, le lait de coco, étant une substance complexe dont la composition peut être variable, il sera préférable d'utiliser la zéatine.

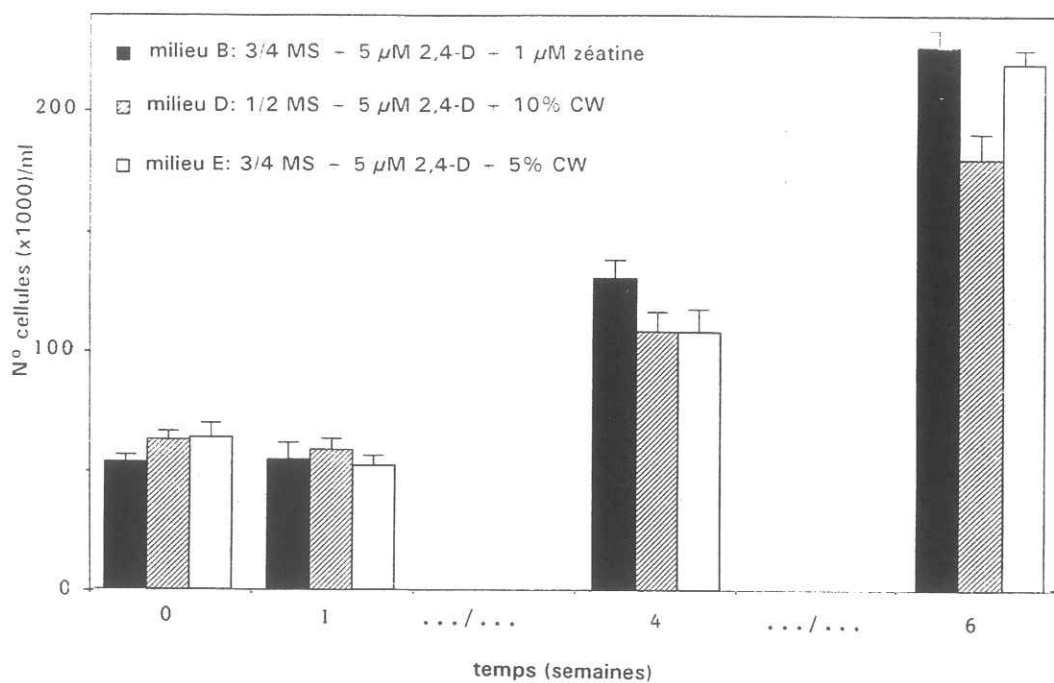


Fig. 23. Effet du milieu de maintenance sur le nombre total de cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu

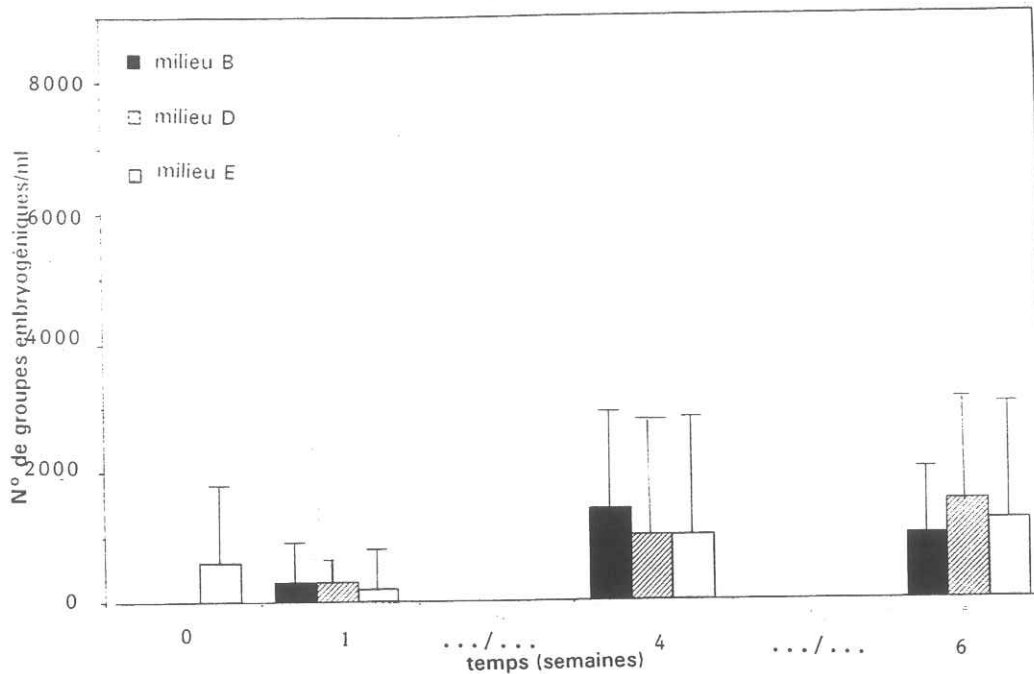


Fig. 24. Effet du milieu de maintenance le nombre de groupes embryogéniques ( $\phi < 0,5$  mm) après rafraîchissement et dilution du milieu

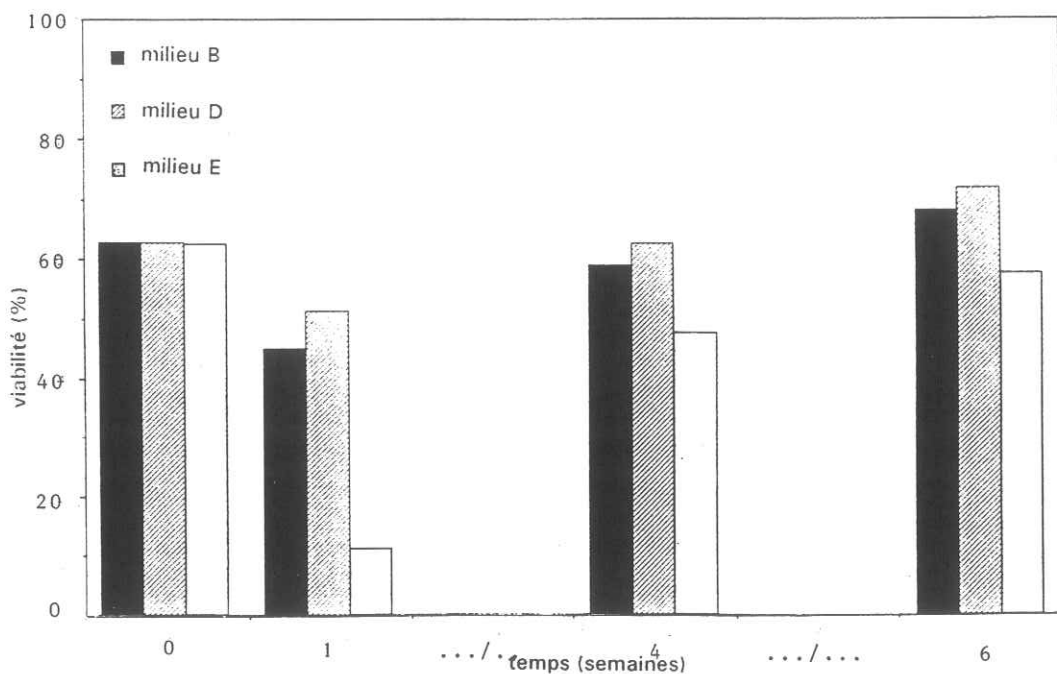


Fig. 25. Effet du milieu de maintenance sur la viabilité des cellules libres après rafraîchissement et dilution du milieu

D'après Henshaw *et al.*(1966), chez *Acer pseudoplatanus*, l'augmentation de la concentration de sels MS a un effet bénéfique sur la multiplication des cellules. Ces auteurs ont cependant montré que cela est du uniquement à l'augmentation des ions  $\text{NH}_4^+$ . Le Milieu MS est particulièrement riche en ions  $\text{NH}_4^+$  (Ammirato, 1984). L'augmentation excessive de la concentration de  $\text{NH}_4^+$  résulte, au contraire, dans la diminution du pH résultant de l'utilisation rapide de ces ions par les cellules, ce qui a une influence défavorable sur la croissance ultérieure de cellules chez *Vitis vinifera* (Do and Cormier, 1991) et arrête le développement des embryons somatiques chez la carotte (Smith and Krikorian, 1990). Dans nos expériences, la différence entre 1/2 et 3/4 MS n'apparaît pas clairement. Nous garderons donc le pour la maintenance, 1/2 MS. De même, la concentration du 2,4-D pourrait rester à 5  $\mu\text{M}$  comme pour l'initiation des suspensions, compte tenu de ses effets mutagéniques, teratogéniques et embryotoxiques (Shoemaker *et al.*, 1991).

L'augmentation du nombre de cellules, d'aggrégats et le maintien à un certain niveau (50-60%) de la viabilité des cellules libres au cours de ces expériences dénotent de l'action favorable des milieux utilisés sur la multiplication des cellules. Les cellules végétales qui se divisent *in vitro* tendent à adhérer les unes aux autres et, avec l'âge de la culture, l'augmentation du nombre de cellules isolées résulte de leur libération par les aggrégats. Ceci montre que l'estimation du nombre de cellules libres et leur viabilité ne donne pas une idée exacte de la croissance de la culture. En effet, les groupes (aggrégats) cellulaires sont constitués de 2 à plus de 100 cellules en division, généralement très viables, mais qui ne sont pas prises en compte individuellement par cette estimation. D'autres mesures sont donc nécessaires comme il sera discuté plus loin (point 2.3.3.2). Les cellules qui ne se divisent pas meurent et la fréquence trop rapprochée de

subcultures augmente plutôt la quantité d'aggrégats cellulaires. Le rapport élevé auxine/cytokinine favoriserait la séparation cellulaire (Narayanaswamy, 1977).

La présence dans les cultures de suspensions, à tout moment, de cellules libres allongées, ovales et rondes et de groupes est conforme avec les caractéristiques de suspensions embryogéniques telles que décrites chez d'autres espèces végétales (McWilliam et al., 1974; Vasil and Vasil, 1981, 1982; Williams and Maheswaran, 1986). Les groupes peuvent évoluer en embryons somatiques globulaires ou des stades cotylédonnaires précoces même en présence du 2,4-D, mais pas davantage (Vasil and Vasil, 1982).

#### 2.3.3.2. Maintenance proprement dite

En utilisant la procédure décrite plus haut, 13 lots différents de suspensions cellulaires embryogéniques ont été obtenus à partir de 4 séries d'initiation de suspensions. Deux séries (6 lots) avaient été initiées avec le lait de coco (CW) comme source de cytokinines et une avec la zéatine (7 lots). Les plus vieilles suspensions ont plus de 3 ans et sont maintenues routinièrement sans perte de potentiel de régénération, dans  $1/2$  MS +  $5 \mu\text{M}$  2,4-D +  $1 \mu\text{M}$  zéatine avec un renouvellement du milieu à intervalle de 3 à 4 semaines. L'évolution du nombre total de cellules libres (cellules allongées, cellules ovales riches en amidon et cellules isolées embryogéniques), de petits groupes embryogéniques est illustré par les figures 26 à 28. D'une manière générale, l'évolution du nombre total de cellules libres ainsi que celle du volume des cellules tassées après centrifugation (packed cell volume) (Fig. 29) suivent l'allure d'une courbe de croissance avec une période de latence, de croissance exponentielle, de plateau et de déclin. Le volume cellulaire

augmente considérablement en 4 semaines (de 1,3% à 8,3% du volume de culture, soit environ 6,3 fois le volume initial).

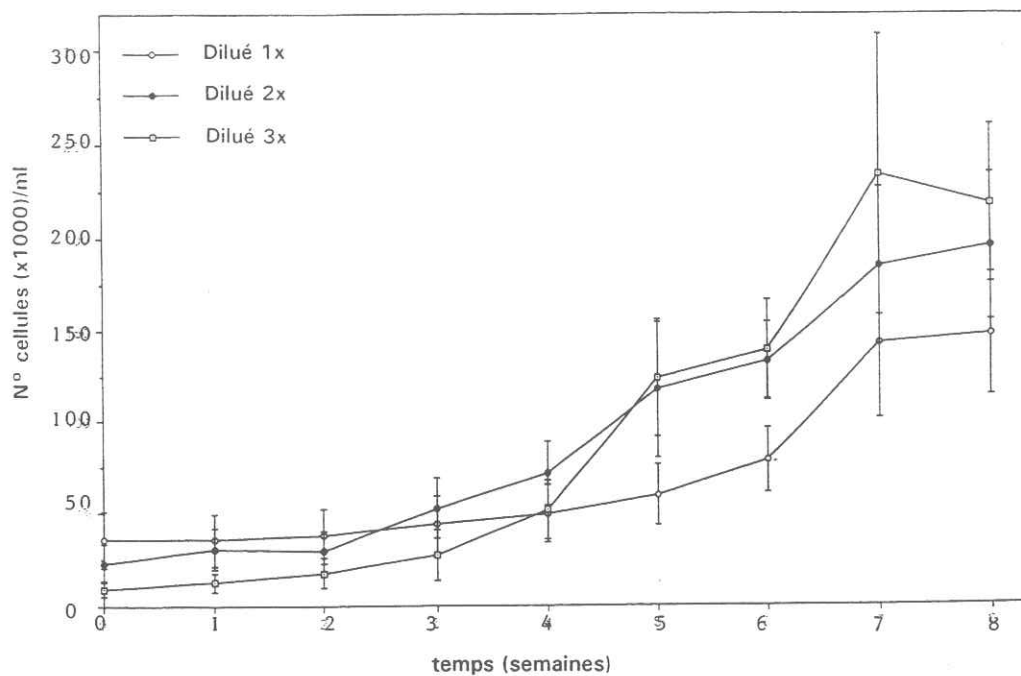


Fig. 26. Evolution du nombre total de cellules libres au cours de la maintenance après subculture et dilution (Milieu: 1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 1  $\mu$ M zéatine)



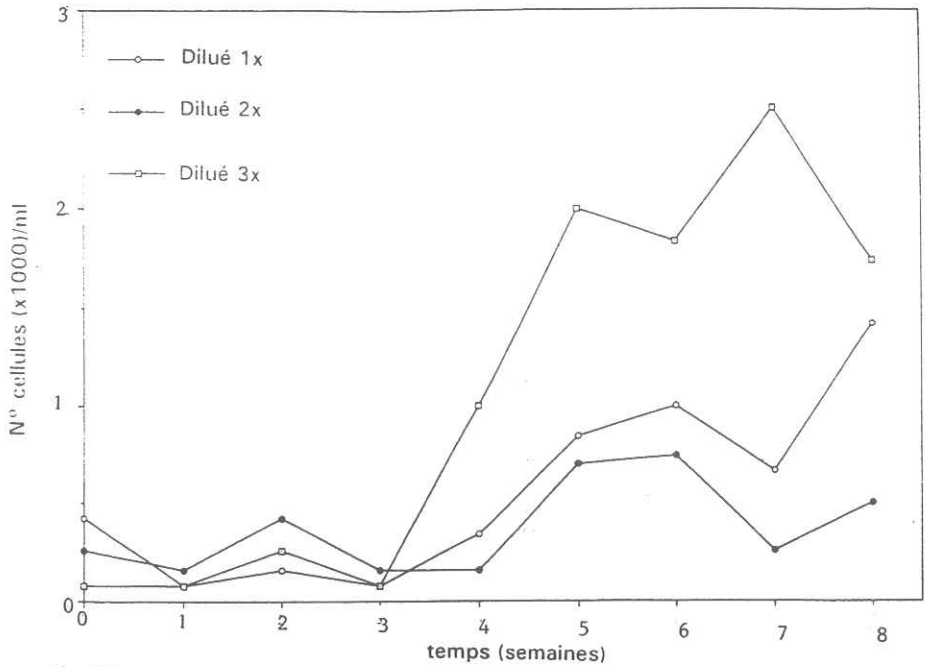


Fig. 27. Evolution du nombre de cellules embryogéniques libres au cours de la maintenance après subculture et dilution (Milieu: 1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 1  $\mu$ M zéatine)

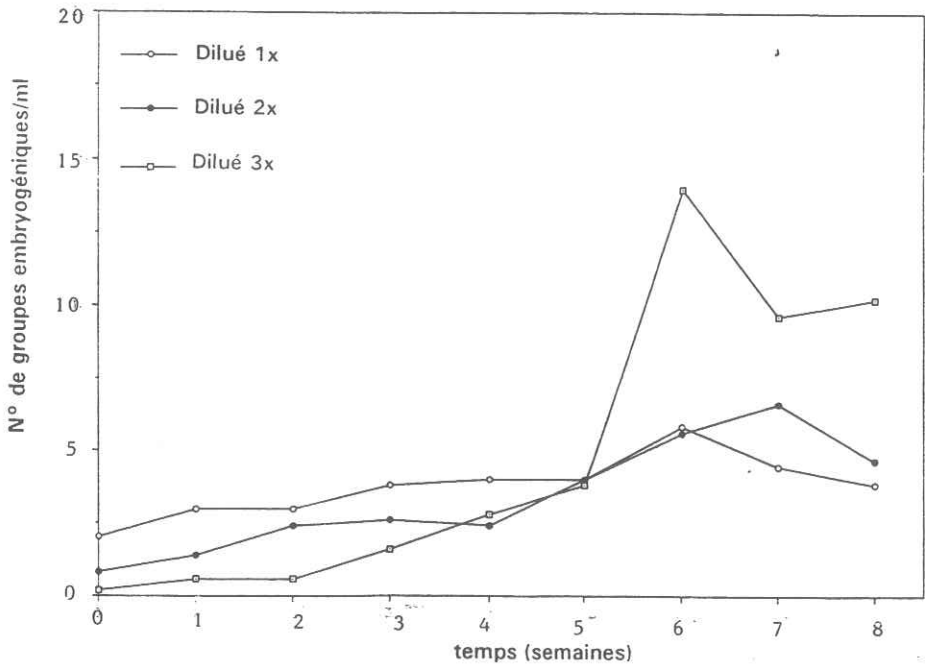


Fig. 28. Evolution du nombre de groupes embryogéniques ( $\phi < 0,5$  mm) au cours de la maintenance après subculture et dilution (Milieu: 1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 1  $\mu$ M zéatine)

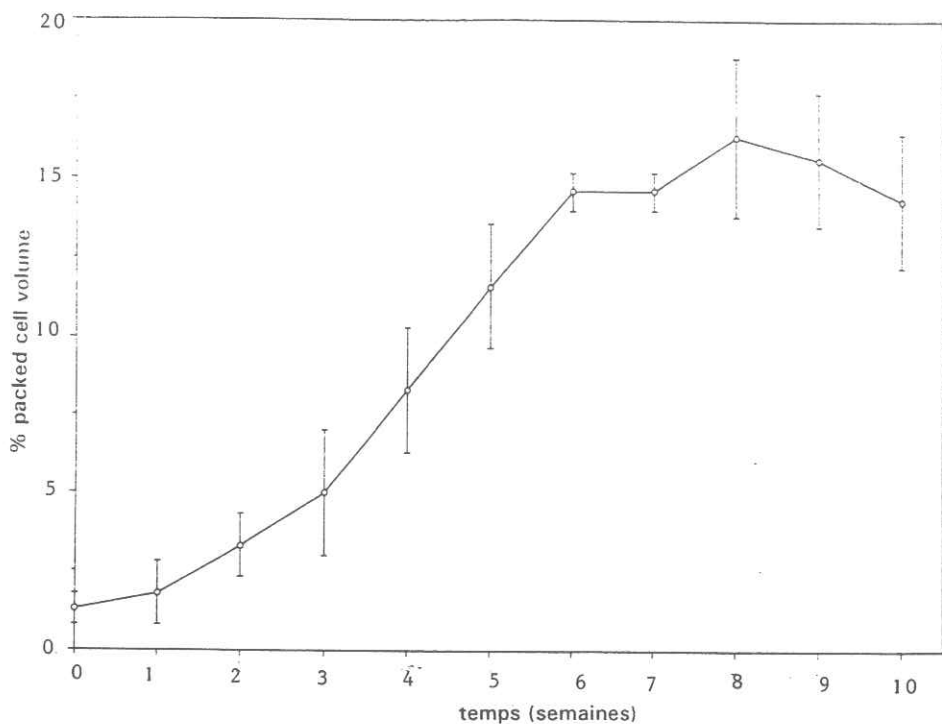


Fig. 29. Croissance de suspensions cellulaires de *Musa* au cours de la maintenance (% packed cell volume)

L'estimation de la croissance cellulaire en suspensions par la méthode de comptage est rendue difficile par la formation d'aggrégats cellulaires. De plus, les prélèvements fréquents pour le comptage augmentent le risque d'infections. Ceci a amené à élaborer des méthodes indirectes de mesure de la croissance, telles que les mesures du volume des cellules tassées (packed cell volume), du poids frais et du poids sec. Ces mesures n'étant elles mêmes pas très précises, à cause des différences qui peuvent résulter de l'inoculum, de l'apport d'oxygène et de la lumière (Schripsema et al., 1990), des nouvelles méthodes permettant de suivre plus facilement la croissance cellulaire ont été proposées. On peut citer, la mesure de la conductivité du milieu (Taya et al., 1989) et le "dissimilation curve" (Schripsema et al.,

1990). La première est basée sur le principe que l'augmentation de la conductivité du milieu est inversement proportionnelle au nombre de cellules, et la deuxième, sur la relation entre la consommation du sucre et la croissance: le sucre du milieu est en partie converti en biomasse et en partie utilisé pour produire de l'énergie.

La courbe de croissance de ces suspensions a été mieux étudiée par le test TTC, le packed cell volume, la masse fraîche et sèche des cellules (Vloeberghs, 1992). Ces études ont montré que la viabilité des suspensions 2 semaines après la dernière subculture peut être très élevée (100% au FDA et 42-100% au test TTC). Pour le nombre total de cellules, il existe des différences significatives (ANOVA, test de Duncan, voir annexe 5) entre les différentes dilutions. La dilution de 1/3 a donné les meilleurs résultats dans nos études et celles de Vloeberghs (1992). La croissance exponentielle se situe entre 2 et 6 semaines. Ceci montre que le renouvellement du milieu peut se faire aussi entre 4-5 semaines pour la maintenance. L'évolution des cellules isolées et des groupes embryogéniques ne présente pas une allure continue. On note plusieurs pics pour l'évolution du nombre des cellules isolées embryogéniques. Les deux premiers pics (Fig. 27) semblent correspondre aux 2 pics obtenus avec le test TTC (Vloeberghs, 1992), mettant ainsi en relation les activités de division représentant au moins 2 cycles au cours de cette période de culture. L'augmentation du nombre de groupes intervient vers la 6ème semaine. En effet, les groupes proviennent des cellules isolées embryogéniques par divisions successives. Les différents types de cellules libres que l'on rencontre dans les suspensions sont principalement relâchées par les groupes avec l'âge de la culture (Narayanaswamy, 1977).

Au cours de la maintenance de suspensions cellulaires, il peut arriver qu'il y ait perte du potentiel embryogénique. Des situations semblables ont également été observées dans nos expériences. Des telles suspensions, généralement à l'aspect laiteux n'étaient pas capables de régénérer des plantules. Ce phénomène peut avoir plusieurs origines dont les subcultures non fréquentes qui favorisent la formation des agrégats cellulaires friables libérant des grandes cellules vacuolées (Zrýd, 1988), la sélection, au cours des subcultures, des cellules non embryogéniques ou la perte du potentiel embryogénique par mutation (Warren, 1991). Les nombreuses subcultures ont alors comme conséquence l'amplification de ce phénomène par sélection des lignées cellulaires non embryogéniques.

#### 2.3.4. Conclusions

Les cultures renfermant des agrégats cellulaires en quantité importante peuvent être définitivement séparées des globules méristématiques restants par filtration. Ces cultures qui constituent des suspensions cellulaires établies peuvent être maintenues par rafraîchissements et dilutions de 1/2 à 1/3.

Le 2,4-D s'est avéré essentiel pour une bonne maintenance des suspensions cellulaires. L'effet des concentrations 1/2 et 3/4 MS ne différant pas beaucoup, l'utilisation de la concentration 1/2 MS est préconisée ainsi que l'utilisation de 5  $\mu$ M 2,4-D en maintenance. Mais, la différence entre 1/2 MS, 3/4 MS et MS d'une part, et entre 5  $\mu$ M et 10  $\mu$ M 2,4-D, d'autre part, devrait être mieux étudiée.

## 2.4. REGENERATION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES EN PLANTULES

### 2.4.1. Introduction

L'étape de la régénération constitue l'aboutissement de la culture de suspensions cellulaires. En effet, une suspension établie n'a de la valeur que si elle est capable de régénérer des plantes entières. La préférence est donnée à la régénération par embryogénèse somatique. Cette voie semble fournir des plantes présentant moins de variation somaclonale (Ammirato, 1989). Le retrait ou la diminution drastique de la teneur en 2,4-D est considérée comme le facteur inducteur de la régénération (Krikorian and Kann, 1981).

### 2.4.2. Matériel et méthodes

#### 2.4.2.1. Régénération de suspensions cellulaires en plantules

Le schéma adopté à partir des expériences d'orientation comprend les étapes suivantes (Fig.30):

**Étape 1.** Induction de la formation en masse des embryons somatiques globulaires:

- la suspension en maintenance (Fig.18C) dans 1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 1  $\mu$ M zéatine (ou 5% CW) est filtrée à travers un tamis (les dimensions des mailles dépendent des objectifs et peuvent varier de 100  $\mu$ m à 1 mm),
- un aliquot du culot (1-2 ml) après sédimentation du filtrat est inoculé dans 20 ml du milieu à 1/2 MS + 100 mg/l myoinositol sans 2,4-D ni autres régulateurs de croissance (milieu R1) pour 3-4 semaines (Fig. 31).

**Etape 2. Maturation des embryons somatiques globulaires:**

les embryons somatiques globulaires sont transférés dans un milieu liquide contenant en plus 1  $\mu$ M BAP ou zéatine (milieu R2) pour 2 semaines.

**Etape 3. Germination des embryons somatiques:**

les embryons somatiques globulaires sont filtrés à travers un tamis de 1 mm et sont transférés sur un milieu semi-solide ou dans un milieu liquide:

**a. sur milieu semi-solide:**

- étalement des embryons somatiques sur le milieu R3 (ce milieu possède la même composition que le milieu R2 mais est solidifié avec 2 g/l de gelrite),
- formation des plantules,

**b. en milieu liquide:**

- réintroduction des embryons somatiques globulaires dans le milieu R2 (R3'),
- renouvellement du milieu jusqu'à la formation des premières plantules
- transfert dans le milieu liquide 1/2 MS sans hormones (R4')

**Etape 4. Développement des plantules:**

les plantules obtenues sont transférées sur un milieu semi-solide sans hormones (milieu R4) avant leur transplantation au sol.

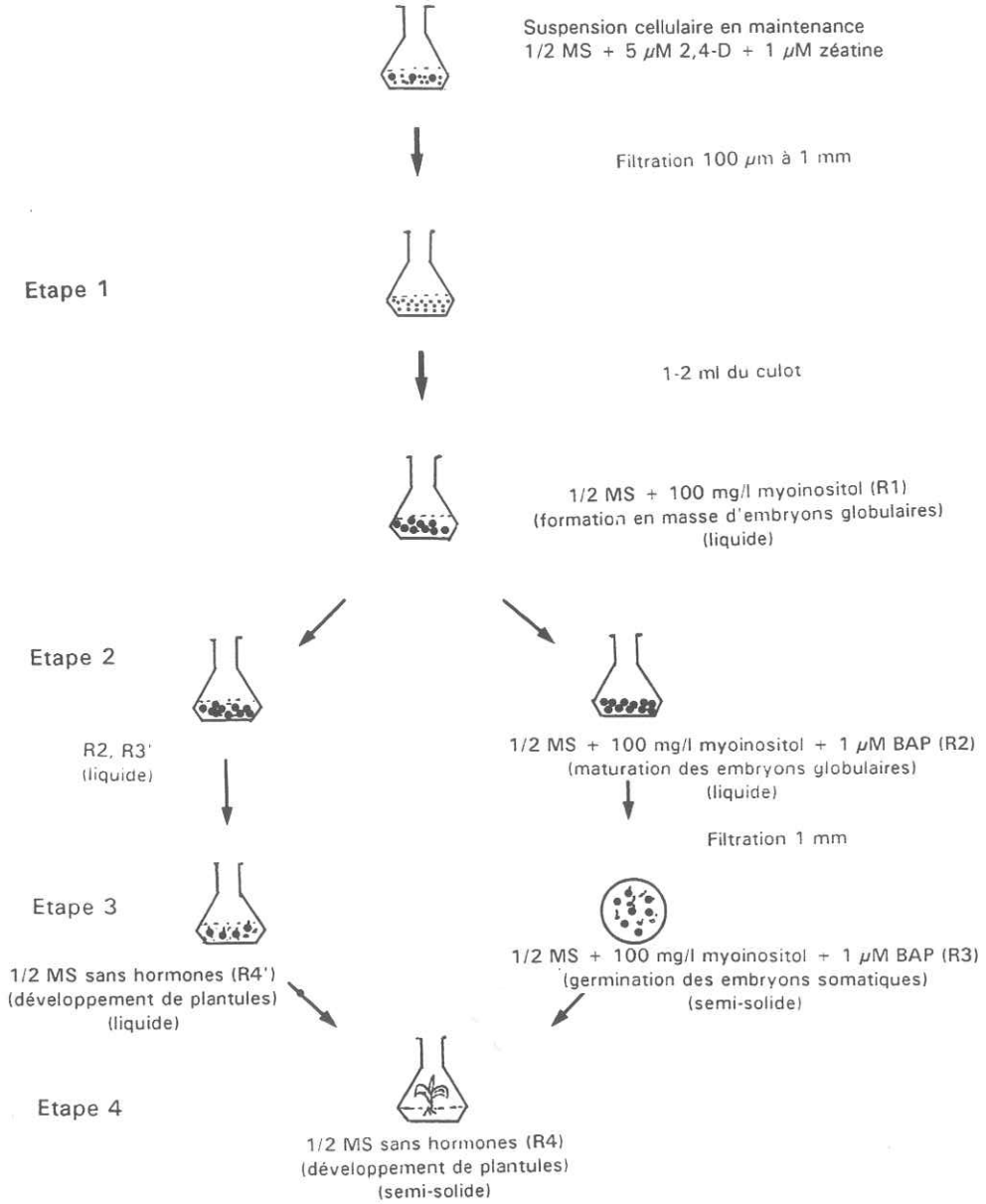


Fig. 30. Schéma de la régénération de suspensions cellulaires embryogéniques en plantules

Certaines substances et régulateurs de croissance sont souvent utilisés dans des milieux de régénération pour moduler le développement des embryons somatiques. L'action particulière du myoinositol, de ABA, de BAP et de la zéatine a été étudiée. L'action du myoinositol a été étudiée au cours de l'induction de la formation en masse des embryons somatiques globulaires (R1) et en milieu de régénération (R3), celle de ABA, en milieu de régénération R3. Deux concentrations de BAP et de zéatine ( $1 \mu\text{M}$  et  $10 \mu\text{M}$ ) ont été testées en milieu liquide de régénération (R2, R3') et en milieu semi-solide (R3), ici à travers 20 combinaisons suivant le milieu en R2.

#### 2.4.2.2. Etude de la variation somaclonale des plantes issues d'embryons somatiques en culture de suspensions cellulaires

Ces dernières années, l'utilisation des plantes de bananier produites par la multiplication *in vitro* a augmenté. Il a été montré que la régénération *in vitro* favorise la création de la variation somaclonale (Larkin and Scowcroft, 1981; Scowcroft, 1984). La probabilité de variation semble encore plus accentuée lorsqu'on utilise des systèmes de cultures cellulaires compte tenu du taux de divisions cellulaires qui amplifie les mutations (Henshaw et al., 1980). De nombreuses études ont alors été suscitées pour évaluer la variation somaclonale chez les plants de bananier micropropagés (Hwang and Ko, 1987; Vuylsteke et al., 1988, 1991).

Des plantules issues d'embryons somatiques (24 plantules) suivant la procédure décrite plus haut dans ce chapitre ont été transplantées sous serres. Elles ont été observées jusqu'à la hauteur de 1,5 m. 140 autres plantules ont été observées en plein champ pendant un cycle de végétation. Les observations ont porté sur les aspects morphologiques anormaux des



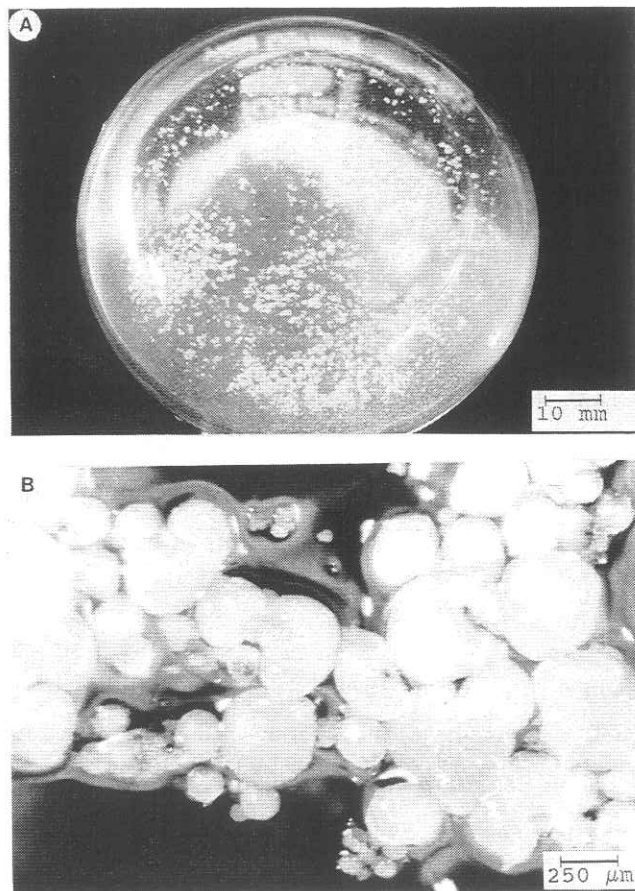
plantes issues d'embryons somatiques par rapport à la morphologie typique des plants de Bluggoe cultivé en champ par multiplication conventionnelle.

#### 2.4.3. Résultats et discussion

##### 2.4.3.1. Régénération de suspensions cellulaires en plantules

Au cours de la première étape de la régénération, des embryons somatiques globulaires sont formés en masse (Fig. 31A) dans le milieu à 1/2 MS + 100 mg/l myoinositol. A cette étape, des cultures effectuées avec ou sans myoinositol n'ont pas montré de différences quant à la formation des embryons somatiques globulaires. Cependant, en l'absence de celui-ci on a observé un développement précoce de racines.

Les embryons somatiques globulaires évoluant en deuxième étape (maturation), deviennent translucides avec un centre opaque après une semaine. Certains se couvrent d'un duvet fin dans le milieu contenant 10  $\mu$ M zéatine. La présence de duvet a déjà été observé sur l'embryon zygotique de *Musa balbisiana* en germination *in vitro* (Afele, 1986) et sur le coléoptile de jeunes pousses de 8 jours de *Paspalum notatum* (Marousky and Shirlye, 1990). La principale caractéristique morphologique des embryons somatiques globulaires à cette étape vue sous microscope stéréoscopique est l'invagination qu'ils portent à l'un des pôles (Fig.31B). Ceux-ci, transférés sur un milieu semi-solide (R3), germent en 3-4 semaines (Fig. 32, 33).



**Fig. 31.** Culture de régénération de suspensions en plantules

- A.** Production en masse d'embryons somatiques globulaires en milieu liquide de régénération.
- B.** Vue détaillée des embryons somatiques montrant différents stades de développement.

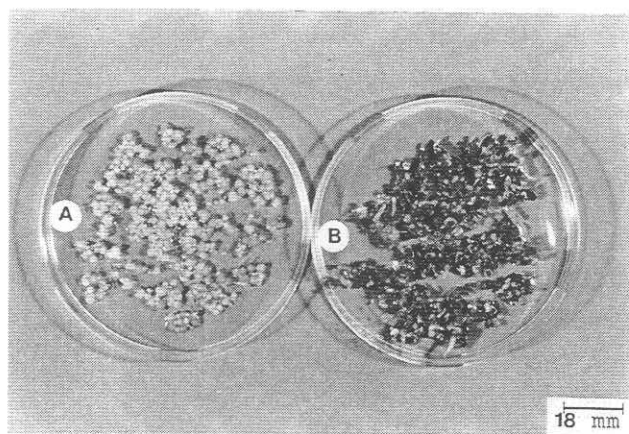


Fig. 32. Germination des embryons somatiques sur milieu semi-solide.  
A: milieu sans cytokinine  
B: milieu avec cytokinine

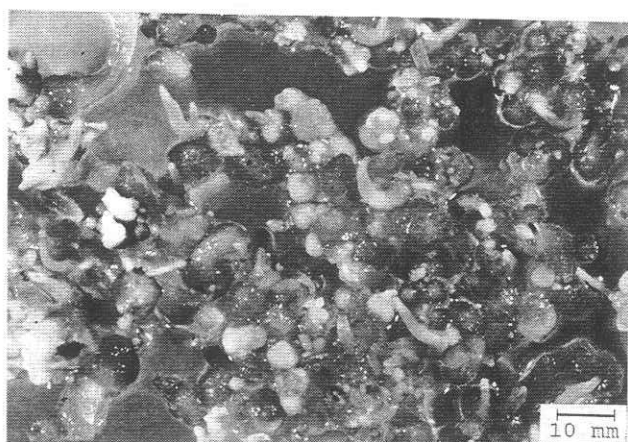
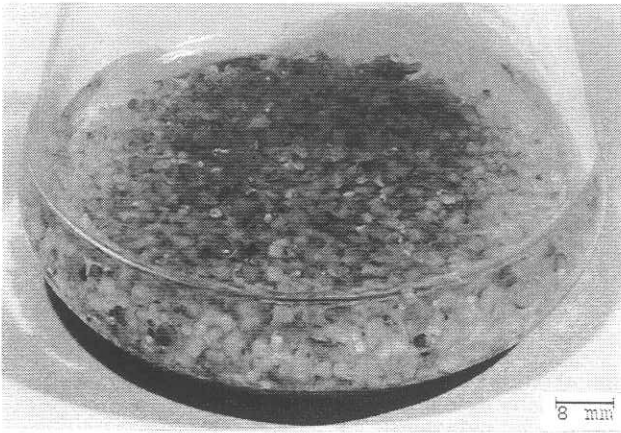
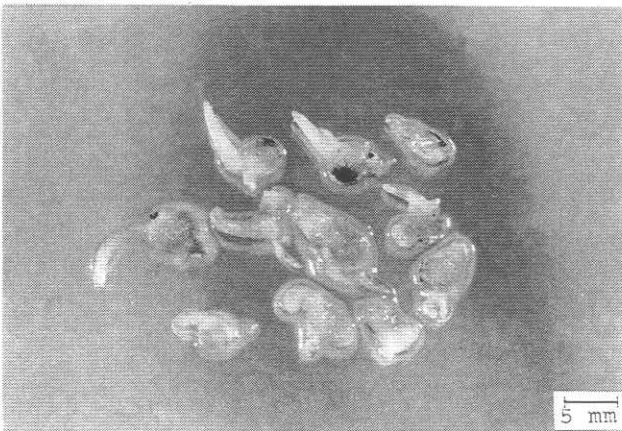


Fig. 33. Détail de germination sur milieu semi-solide

La germination en milieu liquide est illustrée par la figure 34. La morphologie des plantules régénérées, avec ébauches caulinaires et racinaires (Fig. 35), sont typiques des plantes issues des semis (McGahan, 1961), ce qui montre leur origine par embryogénèse somatique (Fig. 34).



**Fig. 34.** Production d'innombrables plantules en milieu liquide.



**Fig. 35.** Détail de plantules issues d'embryons somatiques montrant apex caulinaires et ébauches racinaires.

La fréquence de régénération en milieu liquide (R3') après 3 semaines est illustrée par la figure 36.

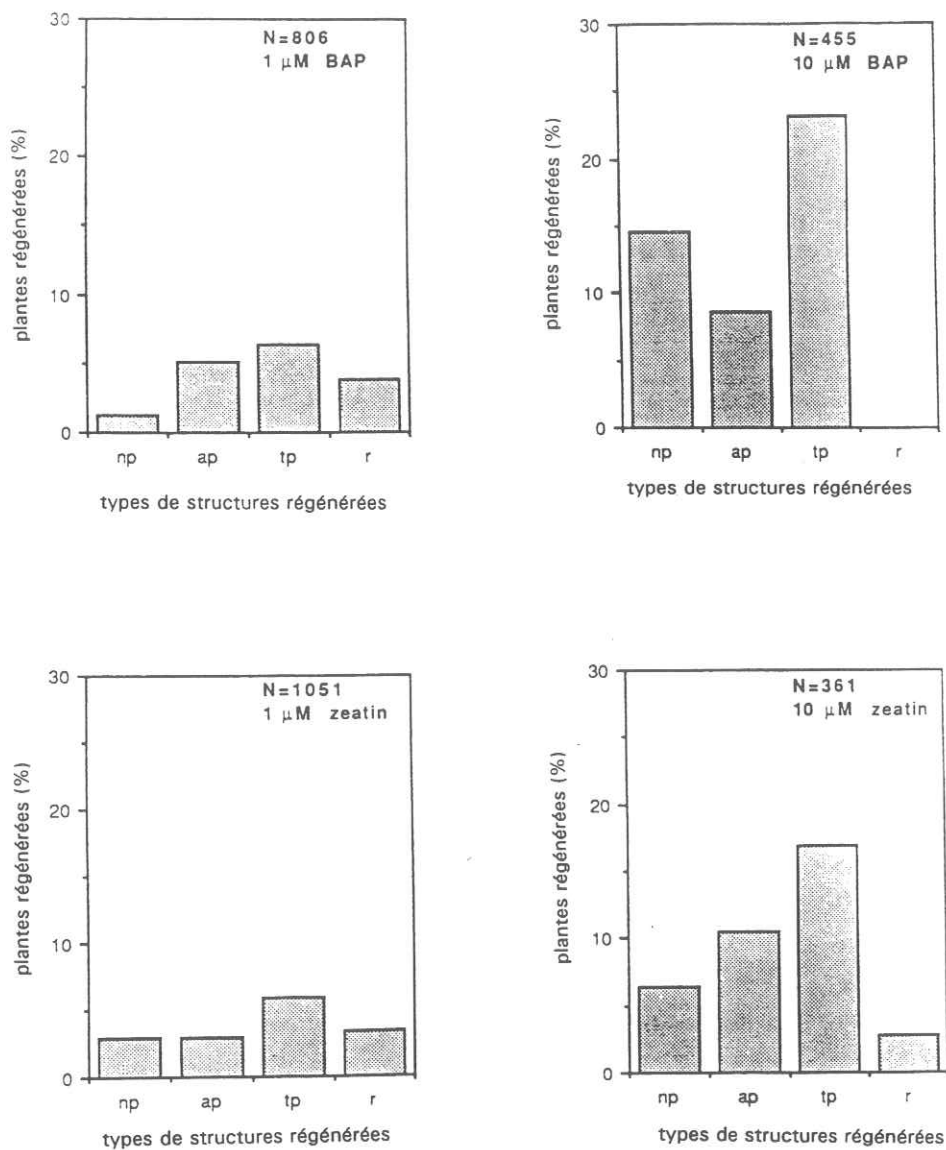


Fig. 36. Fréquence de régénération des embryons somatiques en milieu liquide de germination avec cytokininine (Dhed'a *et al.*, 1991)

np: plantules issues d'embryons somatiques normaux; ap: plantules issues d'embryons somatiques anormaux; tp: total des plantules (np + ap); r: racines; N: nombre total de structures énumérées dans 40 ml de milieu. Observations après 3 semaines.

Les concentrations les plus élevées de cytokinines ont clairement stimulé la conversion des embryons somatiques globulaires en plantules (16,9-23,1% avec 10  $\mu\text{M}$  contre 5,9-6,4% avec 1  $\mu\text{M}$ ). Dans tous les cas les plantules issues d'embryons somatiques anormaux ont été produites, particulièrement avec 10  $\mu\text{M}$  cytokinine (8,6-10,5%) comparée à 1  $\mu\text{M}$  (2,9-5,1%). Le rapport plantules issues d'embryons somatiques normaux/anormaux a été meilleur avec le BAP, mais pas avec la zéatine. Les plantules issues d'embryons anormaux caractérisées par un gonflement colloïde à la base, surmontés quelques fois par plusieurs pousses poursuivent également un développement normal. Le taux total de régénération a pu atteindre 23,1% dans les conditions avec 10  $\mu\text{M}$  BAP à l'étape 3. L'aspect normal ou anormal des plantules à ce stade ne permet pas de prédire leur variation phénotypique pour laquelle il est nécessaire d'attendre jusqu'à la floraison.

Sur milieu semi-solide (R3), l'effet de 2 concentrations de cytokinines (1  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$ ) examiné dans 20 combinaisons est présenté dans le tableau 3. Il montre que la présence de cytokinine à l'étape 2 (2 semaines) est favorable pour une bonne germination. A l'étape 2, 10  $\mu\text{M}$  BAP a donné une fréquence plus élevée de régénération que 1  $\mu\text{M}$ . L'inclusion de 1  $\mu\text{M}$  zéatine à l'étape 2 a résulté dans une meilleure régénération à l'étape 3 sur 10  $\mu\text{M}$  BAP ou zéatine. Les taux totaux de régénération ont pu atteindre 19,3-20,3% dans ces conditions. Dans le cas où 10  $\mu\text{M}$  zéatine est utilisé aux étapes 2 et 3, la production des embryons anormaux est plus importante. Des toutes les combinaisons effectuées en milieu semi-solide, les meilleurs résultats ont été obtenus avec 1  $\mu\text{M}$  zéatine à l'étape 2 et 10  $\mu\text{M}$  zéatine ou BAP à l'étape 3. Les structures non énumérées dans la figure 36 et le tableau 3 sont des colloïdes (2,9-23,6%) et des embryons globulaires non encore régénérés (59,9-90,5%). Ces derniers sont continuellement régénérés grâce aux renouvellement avec du milieu sans

hormones, possibilités offertes par le milieu liquide. Les plantules régénérées poursuivent un développement normal sur le milieu semi-solide (R4) sans régulateurs de croissance (fig. 37).

Tableau 3. Fréquence de régénération de suspensions cellulaires et types de structures régénérées sous l'effet de la concentration de cytokinine en milieu liquide de maturation (étape 2) et en milieu semi-solide de régénération (étape 3).

Observation après 4 semaines sur milieu de germination semi-solide.

Milieu de maturation (étape 2)		Milieu de germination (étape 3)			
		1 $\mu$ M BAP	10 $\mu$ M BAP	1 $\mu$ M zéatine	10 $\mu$ M zéatine
Pas de cytokinine	%pn	1,4	0,0	0,0	5,9
	%pa	0,0	0,0	1,9	4,8
	%pt	1,4	0,0	1,9	10,7
	%r	8,7	4,0	4,8	3,2
	N	155	127	222	153
1 $\mu$ M BAP	%pn	1,2	4,7	3,2	7,0
	%pa	2,9	2,5	4,8	12,3
	%pt	4,1	7,2	7,0	19,3
	%r	2,3	0,9	1,4	1,0
	N	156	197	214	186
10 $\mu$ M BAP	%pn	3,5	6,9	3,5	6,6
	%pa	5,2	5,6	8,5	1,5
	%pt	8,7	12,5	12,0	8,1
	%r	0,4	0,6	0,9	1,7
	N	257	280	261	190
1 $\mu$ M zéatine	%pn	7,5	10,2	7,4	11,2
	%pa	8,1	0,0	7,0	9,1
	%pt	15,6	10,2	14,4	20,3
	%r	6,0	0,6	9,6	1,7
	N	351	287	405	414
10 $\mu$ M zéatine	%pn	0,0	0,0	1,4	5,3
	%pa	7,8	7,3	0,0	11,5
	%pt	7,8	7,3	1,4	16,8
	%r	3,3	0,0	1,7	0,0
	N	57	92	66	64

pn: plantules issues d'embryons somatiques normaux

pa: plantules issues d'embryons somatiques anormaux (pôle racinaire calloïde, plusieurs pousses)

pt: pn + pa (total de plantules régénérées)

r: racines

N: nombre total de structures différenciées et non encore différenciées comptées.

L'action de ABA et de myoinositol à cette étape n'a pas été remarquable. Néanmoins, le milieu semi-solide avec ABA ou myoinositol se sont caractérisés par un développement faible de racines.

Le rôle de ABA a été mise en évidence chez *Carum carvi* (Ammirato, 1974) et chez *Mangifera indica* (De Wald, 1989) dans la formation d'embryons somatiques normaux (Ammirato, 1983), celui des hexitols, dont le myoinositol, dans la modulation de l'embryogénèse (Zrýd, 1988). Dans nos conditions expérimentales, la poussée des racines ayant été plus faible avec myoinositol, l'utilisation de l'ABA apparaît superflue.

Les cytokinines utilisées se sont avérées essentielles pour une bonne germination (Fig. 32), car sans cytokinines, la germination a été nulle ou faible. Le rôle de BAP est bien connu dans la maturation (développement des cotylédons) des embryons somatiques (Rashid, 1988; De Wald, 1989) et l'embryogénèse somatique directe à partir des cotylédons chez certaines dicotyledones (Williams and Maheswaran, 1986). Son rôle a aussi été invoqué dans l'induction de l'embryogénèse somatique à partir d'embryons immatures de *Abies nordmanniana* (Nørgaard and Krogstrup, 1991). De même, Novak et coll. (1989) ont montré que la zéatine était essentielle pour la conversion des embryons somatiques de bananier en plantules dans la culture de suspensions cellulaires obtenues des cals à partir des tissus de rhizome et de bases de feuilles.

#### 2.4.3.2. Variation somaclonale

Toutes les plantules transplantées sous serre ont grandi normalement et très vigoureusement (Fig. 38). Sur les 140 plantules transplantées en plein champ à la Sous-station de l'IITA à Onne (Nigeria), un seul variant



phénotypique, soit 0,7%, a été observé. Ce variant se caractérise par une distorsion des feuilles et une croissance très lente. Il ne fleurit pas encore alors que toutes les autres plantes de la même génération ont déjà été récoltées. La fréquence de 0,7% de variants peut être considérée comme satisfaisante. En effet, chez différents cultivars de bananiers étudiés, 2,3-30% de variants ont été observés chez le Cavendish (*Musa* spp., groupe AAA) (Hwang and Ko, 1987), et même jusqu'à 64,1% chez certains bananiers plantains micropropagés (Vuylsteke *et al.*, 1988, 1991).

Dans les études effectuées, la variation affecte les feuilles, l'inflorescence et le port général de la plante. Certaines variations observées chez les bananiers plantains sont agronomiquement indésirables (Vuylsteke *et al.*, 1988). Pendant que certaines variations sont stables au cours des différents cycles de multiplication *in vitro* et *in situ*, d'autres sont instables suivant qu'on se trouve *in vitro* ou *in situ*. De plus, les variations semblent liées aux cultivars et non directement aux conditions de culture *in vitro*. Ce dernier jouerait seulement un rôle dans l'intensité de leur expression (Vuylsteke *et al.*, 1991).

Une faible fréquence de variation somaclonale a été observée au cours de ce travail. Bien que l'on considère que les plantes issues d'embryons somatiques soient moins vouées aux variations (Kobayashi, 1987, Vasil, 1987, Ammirato, 1989), pour confirmer cette affirmation pour notre système de régénération, il faudra, que les expérimentations portent sur un grand nombre de plantes par cultivar et sur plusieurs cultivars dont ceux présentant déjà des variations élevées en système conventionnel comme certains bananiers plantains.

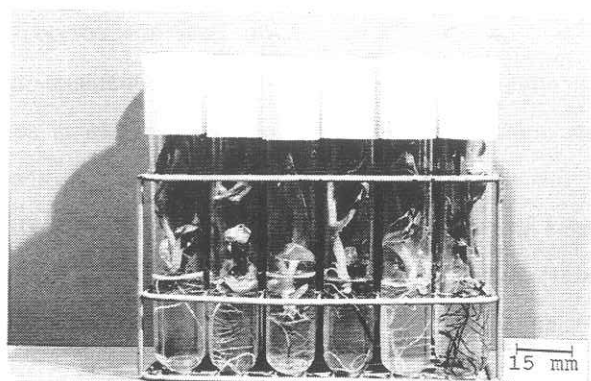


Fig. 37. Plantules de bananier issues d'embryons somatiques se développant sur milieu semi-solide sans régulateurs de croissance



Fig. 38. Plantes issues d'embryons somatiques en croissance normale en serre

#### 2.4.4. Conclusions

L'ensemble des observations sur la régénération permet d'affirmer que la régénération de suspensions peut se faire en suivant 4 étapes. Ces étapes comprennent l'induction de la formation des embryons globulaires dans un milieu sans 2,4-D, leur maturation en présence de cytokinine, leur germination en milieu liquide ou semi-solide en présence de cytokinine et leur développement en plantules sur un milieu semi-solide sans hormones avant leur transplantation dans le sol.

Le taux de régénération a pu atteindre 23,1% dans le traitement avec 10  $\mu\text{M}$  BAP en milieu liquide. Les cytokinines ont été essentielles pour la maturation et la germination des embryons somatiques. Le milieu liquide donne la possibilité de renouvellement du milieu, ce qui permet la production continue de plantules, grâce à la formation des nouveaux embryons somatiques.

Le schéma global de la culture de suspensions cellulaires et sa régénération en plantules tel que décrit dans cette étude est résumé par la figure 39. Le tableau 4 donne les milieux utilisés ainsi que les temps minima pour la réalisation de chaque étape.

La fréquence de variation somaclonale de 0,7% enregistrée chez les plantes issues des embryons somatiques en cultures de suspensions cellulaires peut être considérée comme satisfaisante.

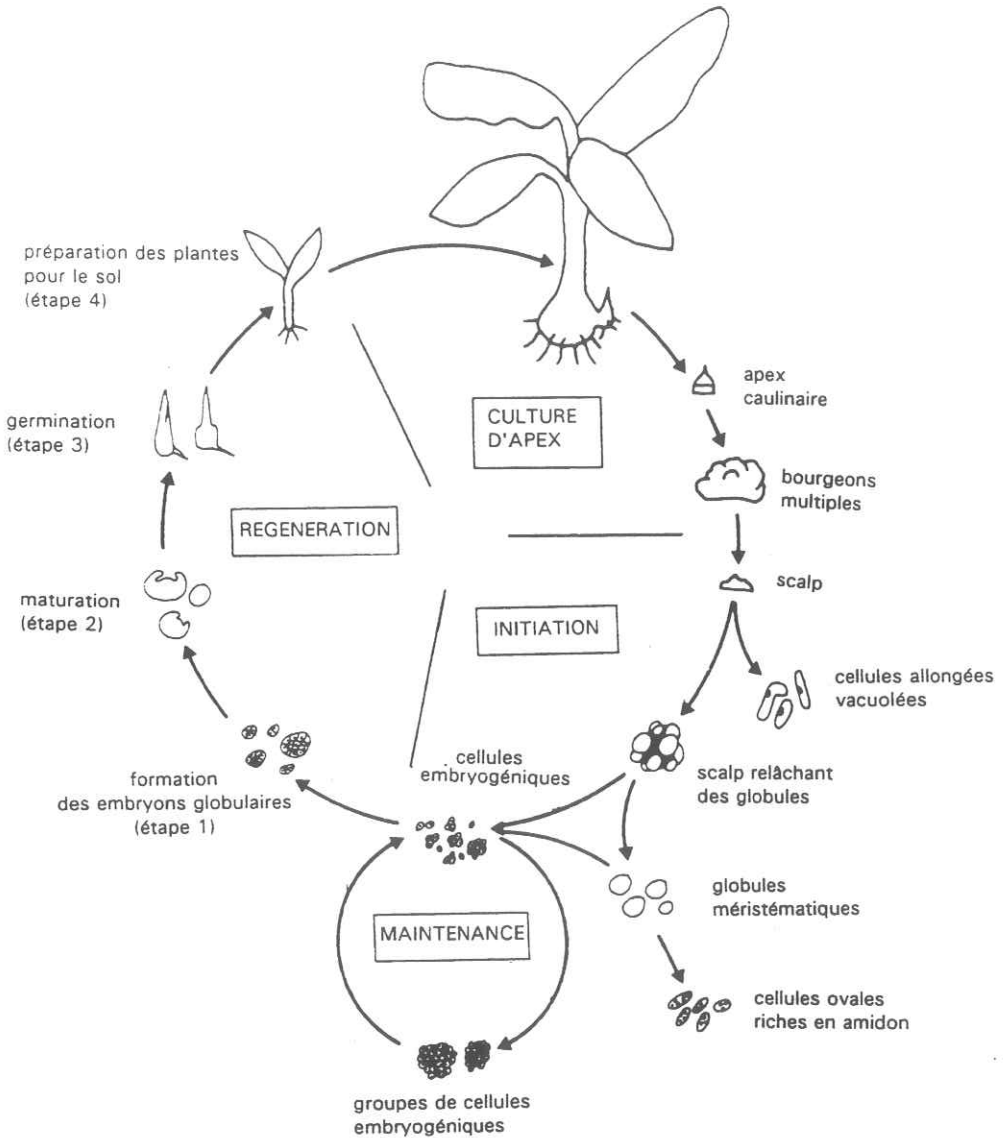


Fig. 39. Représentation schématique de la culture de suspensions cellulaires embryogéniques et de régénération de plantes à partir d'elles chez *Musa ABB*, cv. Bluggoe (Dhed'a et al., 1991).

Tableau 4. Type de milieu et temps requis pour la culture de suspensions cellulaires embryogéniques et leur régénération en plantules chez le bananier en utilisant l'apex caulinaire comme explant.

Etapes	Milieux	Durée
Culture d'apex	MS (semi-solid) + 1 $\mu$ M AIA + 10 $\mu$ M BAP	pas important (transferts sur milieu frais après chaque 3 semaines)
Initiation	1/2 MS (liquide) + 5 $\mu$ M 2,4-D  + 1 $\mu$ M zéatine	4-6 mois (2-3 semaines d'intervalles de rafraîchissements)
Maintenance	1/2 MS (liquide) + 5 $\mu$ M 2,4-D  + 1 $\mu$ M zéatine	pas important (3-4 semaines d'intervalles de rafraîchissements)
Régénération		
étape 1	1/2 MS (liquide) + 100 mg/l myoinositol	3-4 semaines
étape 2	1/2 MS (liquide) + 100 mg/l myoinositol + 1-10 $\mu$ M BAP ou zéatine	2 semaines
étape 3	1/2 MS (liquide ou semi-solide) + 100 mg/l myoinositol + 1-10 $\mu$ M BAP ou zéatine	4 semaines
étape 4	1/2 MS (semi-solide)	2 mois

### CHAPITRE III. ETUDES MORPHOLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE EN CULTURES DE SUSPENSIONS CELLULAIRES

#### 3.1. Introduction

Dans la culture de suspensions cellulaires décrite au chapitre II, des plantes ont été régénérées. Ce chapitre, consacré à l'étude morphologique et histologique, présentera l'origine des cellules embryogéniques en suspension et l'évolution de ces cellules en embryons somatiques et en plantules. Le processus sera étudié en détail au niveau des stades proembryonnaires précoces et comparé à l'embryogénèse zygotique chez le bananier sauvage.

#### 3.2. Matériel et méthodes

##### 3.2.1. Origine de cellules embryogéniques en suspensions

Comme décrit au chapitre II, les suspensions cellulaires embryogéniques sont établies à partir d'un explant de bourgeons méristématiques en prolifération ou scalp. Dans cette procédure, des globules méristématiques sont d'abord produits par le scalp et libérés dans le milieu. Le processus de formation de ces globules a été étudié par Sannasgala (1989) et récemment par Speleman (1992) à partir des coupes d'échantillons de scalp prélevés à différents moments de la culture d'initiation en présence du 2,4-D.

Pour étudier l'origine des cellules embryogéniques en suspensions, différentes structures présentes dans une culture d'initiation contenant globules méristématiques et groupes embryogéniques (Fig. 18A) ont été

prélevées. Les échantillons destinés aux études histologiques ont été soumis à 2 types de fixation et coloration:

-la fixation au FAA (Formaldéhyde-Acide acétique glacial-Alcool 70% - 5:5:90 v/v), suivie de l'enrobage dans la paraffine, la coupe en série à une épaisseur de 9  $\mu\text{m}$  et la coloration à la safranine-fast green (Berlyn and Miksche, 1976);

-la fixation dans 3% glutaraldéhyde dans un tampon phosphate à 0,06 M (pH 6,8), suivie de l'enrobage dans l'historesine LKB 2218-500, la coupe avec un couteau en verre à une épaisseur de 3  $\mu\text{m}$ , la coloration de l'amidon et des matériaux de la paroi avec le PAS (Periodic Acid Schiff) et des protéines avec l'haematoxyline de Regaud (McManus, 1946; Fisher, 1968). Les coupes ont été observées sous un microscope photonique Leitz Dialux 20

### 3.2.2. Evolution des cellules embryogéniques en embryons somatiques et en plantules

Pour cette étude, les échantillons ont été prélevés à différentes étapes de la régénération:

-à l'étape 2 dans le milieu liquide R2 (Fig. 30),

-à l'étape 3 dans le milieu semi-solide (R3) et liquide (R3'). Pour effectuer des comparaisons avec l'embryogénèse zygotique, des échantillons d'ovaires prélevés chez *Musa velutina* et *M. acuminata* à 1-9 semaines après la floraison ont été utilisés. Les échantillons de *M. velutina* étaient récoltés sur place sur des plantes en croissance en serres et ceux de *M. acuminata* provenaient de Onne, sous-station de l'IITA (Nigeria). Ils ont été fixés, enrobés, coupés en série, colorés et observés suivant les techniques décrites au point 3.2.1. Des observations morphologiques directes ont été

effectuées au microscope stéréoscopique et des observations morphologiques plus détaillées, au microscope électronique à balayage Philips PSEM 500 à 25 KV. Dans ce cas, les échantillons étaient fixés dans 50% glutaraldéhyde dans un tampon de cacodylate à 0,14 M (pH 6,8), déshydratés dans une série de bains d'éthanol de degrés croissants, déséchés jusqu'au point critique et métallisés à l'or.

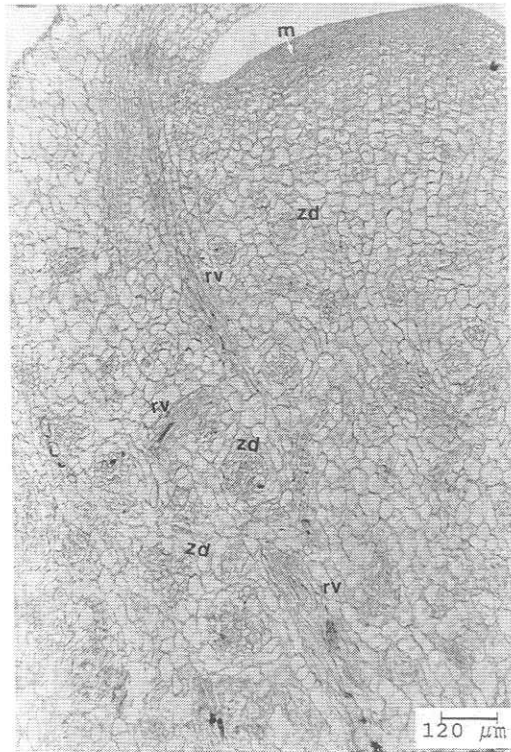
### 3.3. Résultats et discussion

#### 3.3.1. Origine de cellules embryogéniques en suspensions cellulaires

Au cours de l'étape d'initiation, des structures globulaires blanches (globules méristématiques) sont produites par les scalps et relâchées dans le milieu. Des cellules libres allongées et ovales non embryogéniques sont également produites à cette étape. Celles-ci sont directement relâchées par les tissus présents, en l'occurrence les globules méristématiques.

Le processus de la formation de ces globules méristématiques décrit par Sannasgala (1989) est résumé par les figures 40 à 43. Au stade initial le scalp est constitué d'une zone méristématique et d'un tissu basal comprenant des réseaux procambiaux et des vaisseaux conducteurs (Fig. 40). Aux alentours de ces réseaux, on observe des zones denses, signes des activités de divisions cellulaires. Ces activités apparaissent entre 12 et 14 jours (Sannasgala, 1989).





**Fig. 40.** Coupe dans un scalps prélevé 2 semaines après la dernière subculture.

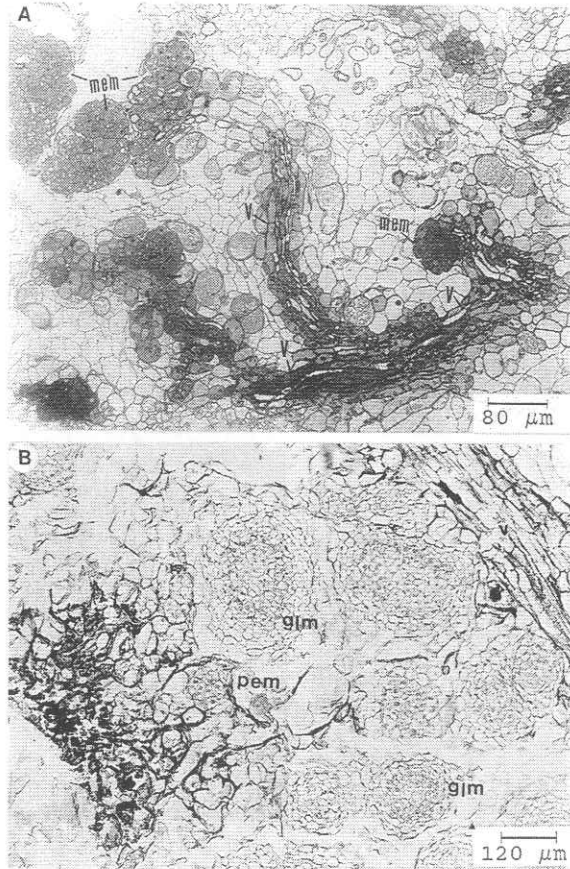
**m:** méristème; **rv:** réseau vasculaire; **zd:** zone de densification cellulaire.

Des telles densifications cellulaires avaient aussi été observées dans la callogénèse de feuilles du bananier (Bakry et Rossignol, 1985). Lors que les scalps sont introduits en milieu liquide contenant du 2,4-D et cytokinine, on observe la formation des masses proembryogéniques à partir de certaines

cellules de la région périvasculaire, au départ non embryogéniques, qui ont acquis des caractéristiques embryogéniques sous l'effet du 2,4-D (Fig. 41A). Après une vingtaine de jours, pendant que l'on assiste à la dégradation de la zone méristématique du scalp et de son épiderme, on observe une montée de l'intérieur vers l'extérieur de ces masses proembryogéniques avec ça et là des îlots globulaires, tous avec des cellules denses. Alors que certains de ceux-ci gardent leur structure embryogénique à l'intérieur du scalp, d'autres se différencient déjà en structures globulaires en 3 couches (Fig. 41B). Libérés sous forme de globules blancs (Fig. 42A), tous évoluent en des structures en 3 couches distinctes (globules méristématiques)(Fig. 42B et C):

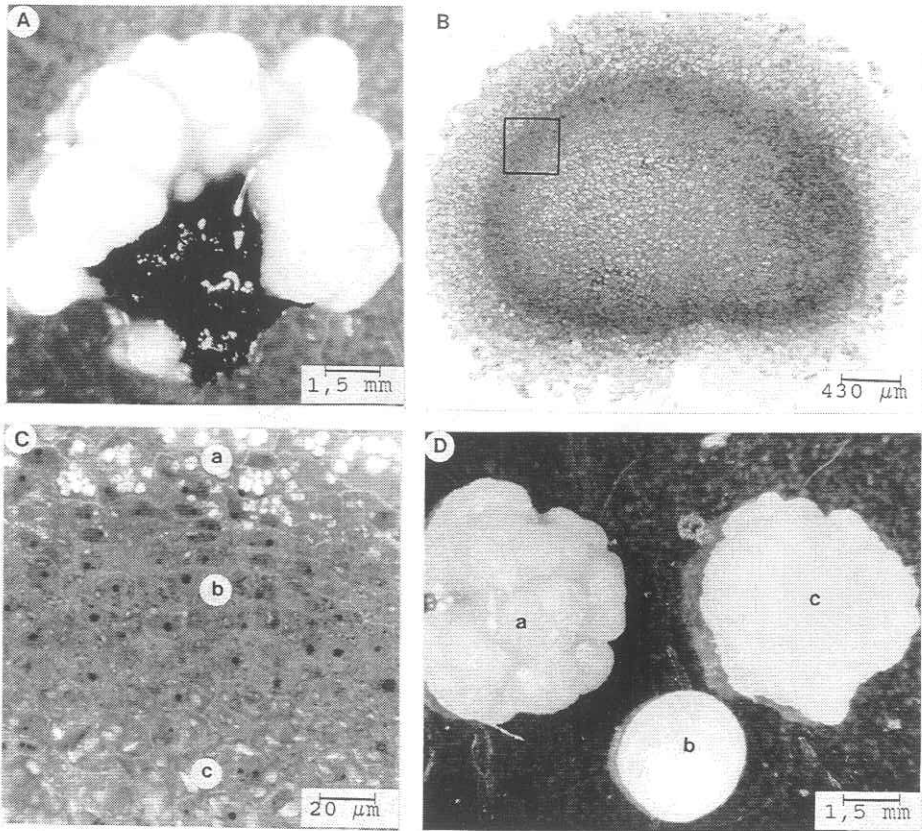
- la couche externe avec cellules ovales remplies de grosses réserves d'amidon et lâches vers la surface,
- la couche intermédiaire avec des cellules très denses,
- la couche centrale avec des cellules devenant parachymateuses vers le centre.

La production de globules méristématiques débute entre 3 et 4 semaines, les scalps sont enlevés entre 8 et 12 semaines et les groupes embryogéniques apparaissent entre 16 et 24 semaines.



**Fig. 41. Formation des masses proembryogéniques et leur évolution en globules méristématiques.**

- A. Formation des masses proembryogéniques.**  
**B. Evolution des masses proembryogéniques en globules méristématiques.**  
 glm: globule méristématique; mem: masse proembryogéniques; pem: proembryon; v: vaisseaux.



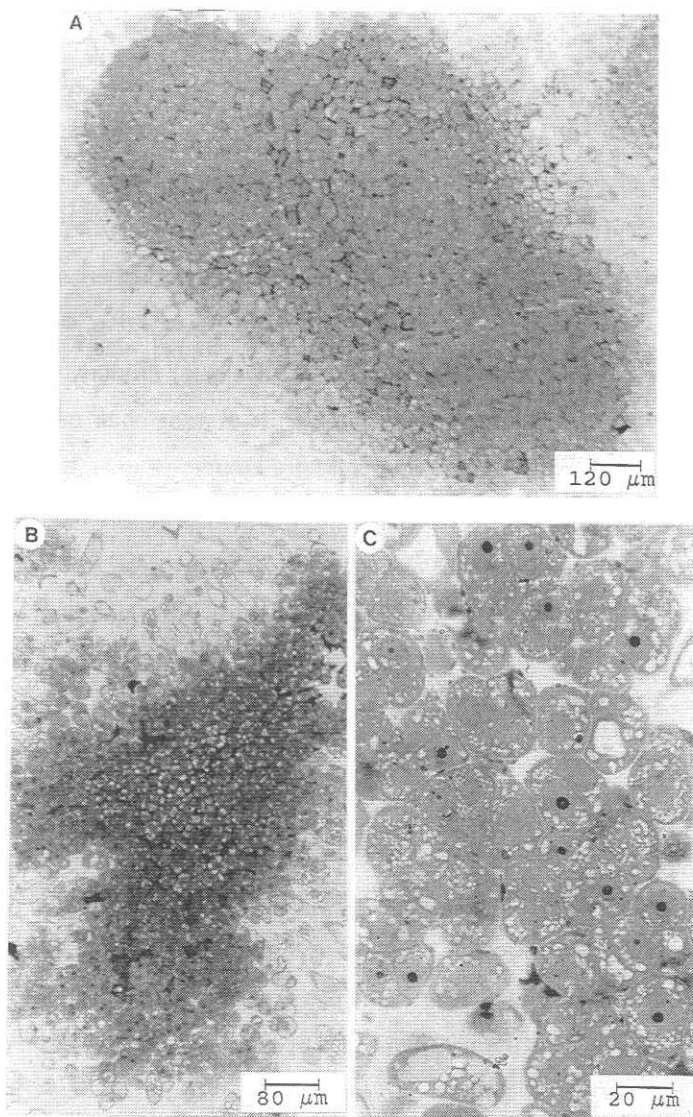
**Fig. 42. Globules méristématiques.**

- A.** Scalp (partie noircie) couvert de globules méristématiques blanches.
- B.** Coupe dans un globule de 3 mm de diamètre avec 3 couches.
- C.** Détail de B. a: couche externe avec cellules lâches vers la surface riche en grosses granules d'amidon; b: couche intermédiaire avec cellules très denses (zone pseudo-cambiale); c: couche interne avec cellules devenant parachymateuses vers le centre.
- D.** Globule méristématique habitué en prolifération (a) et globules méristématiques évoluant en complexes embryogéniques blancs opaques (b,c).

Les observations effectuées sur les coupes des échantillons prélevés des cultures avec production de groupes embryogéniques permettent de reconstituer les étapes de la formation des cellules embryogéniques à partir des globules méristématiques. Certains globules méristématiques deviennent blanc opaque avec un contour irrégulier (Fig.42D). Les coupes montrent que ces globules, suite à une intense activité de divisions cellulaires de la couche intermédiaire aux cellules denses, deviennent entièrement méristématiques (complexe embryogénique) (Fig. 43A). Cette structure, au départ à apparence compacte, se désintègre en libérant continuellement des cellules isolées et des groupes cellulaires embryogéniques (Fig. 43B). Une observation détaillée montre la présence de groupes cellulaires caractéristiques de l'embryogénèse (Fig.43C). Cet ensemble, débarrassé de ses tissus, constitue une suspension cellulaire embryogénique établie. Mais, pour le moment, il reste encore à comprendre, d'une part, pourquoi, certaines masses proembryogéniques se différencient déjà à l'intérieur du scalp en une structure en 3 couches, et d'autre part, pourquoi certains globules méristématiques évoluent en complexes embryogéniques capables de libérer des cellules et groupes embryogéniques pendant que d'autres ne le font pas.

Les événements décrits ci-dessus ressemblent à ceux observés lors de la formation des embryons somatiques chez le palmier à huile à partir d'un cal d'explant foliaire. La couche avec cellules denses a été appelée "zone pseudo-cambiale" chez le palmier (Schwendiman *et al.*, 1988) et chez un cal à partir de feuille de bananier (Bakry et Rossignol, 1985). Chez *Panicum maximum*, la mitose initiale conduisant à la formation d'un cal embryogénique débutait toujours au niveau des cellules adjacentes au procambium (Lu and Vasil, 1985). Chez *Solanum aviculare*, l'initiation du

développement embryogénique était aussi toujours observée au niveau des cellules directement associées aux éléments vasculaires (Alizadeh and Mantell, 1991).



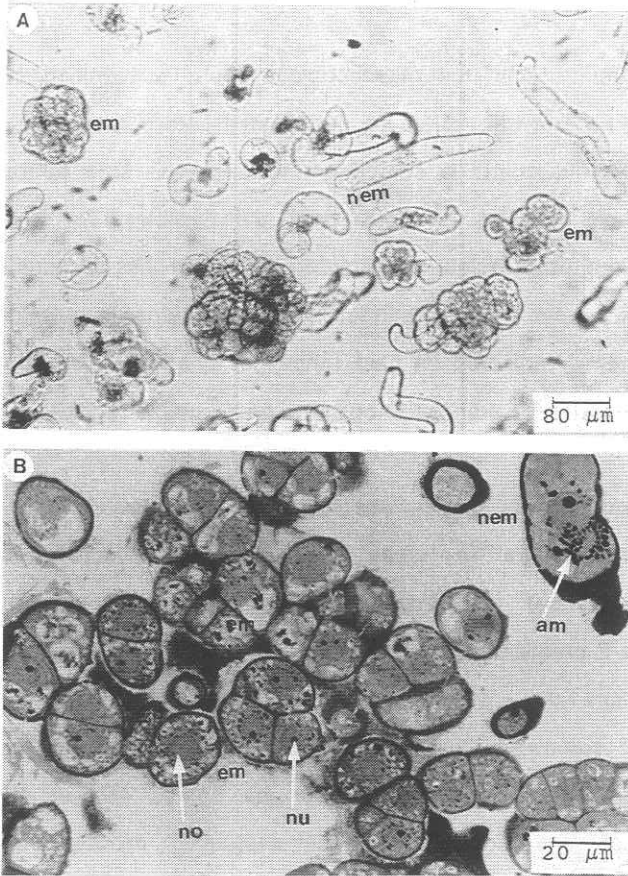
**Fig. 43.** Formation des cellules et groupes embryogéniques.

- A.** Globule devenu entièrement méristématique (complexe embryogénique).
- B.** Désintégration du complexe embryogénique avec libération de cellules et groupes embryogéniques.
- C.** Détail de la surface en désintégration montrant cellules et groupes embryogéniques.

### 3.3.2. Evolution de cellules embryogéniques en embryons somatiques et en plantules

La figure 44 montre une vue microscopique d'une suspension cellulaire embryogénique à l'état frais et les coupes illustrant les caractéristiques des cellules embryogéniques qui la composent. Ces cellules sont petites avec des gros noyaux dont les nucléoles sont bien visibles. On y observe également des petites granulations d'amidon (Fig. 44B). Les photons en noir et blanc ne permettent pas de distinguer les granulations de protéines, car elles sont petites et colorées en bleu foncé par l'haematoxiline alors que celles d'amidon sont plus grandes et colorées en rouge par le PAS.

Une vue d'une culture de suspensions cellulaires en phase de régénération est donné par la figure 45 (étape 1). Les coupes effectuées sur les échantillons provenant de l'étape 2 de régénération permettent de reconstituer les 2 premiers stades principaux de l'embryogénèse, à savoir le stade unicellulaire (Fig. 46A) et le stade globulaire (Fig. 47A) dans l'embryogénèse somatique. La comparaison de ces stades avec ceux de l'embryogénèse zygotique est donnée par les figures 46B et 47B. On observe une similitude parfaite dans le développement de ces deux types d'embryons à ces stades. Le caractère clé du stade globulaire est l'épidermisation complète qui est présente dans les 2 types d'embryogénèse.



**Fig. 44.** Vue microscopique d'une suspension cellulaire embryogénique.

- A.** Suspension cellulaire à l'état frais.  
**B.** Suspension cellulaire en coupe histologique.  
 em: cellules ou groupes embryogéniques; nem: cellules non embryogéniques; no: noyau; nu: nucléole; am: granules d'amidon.



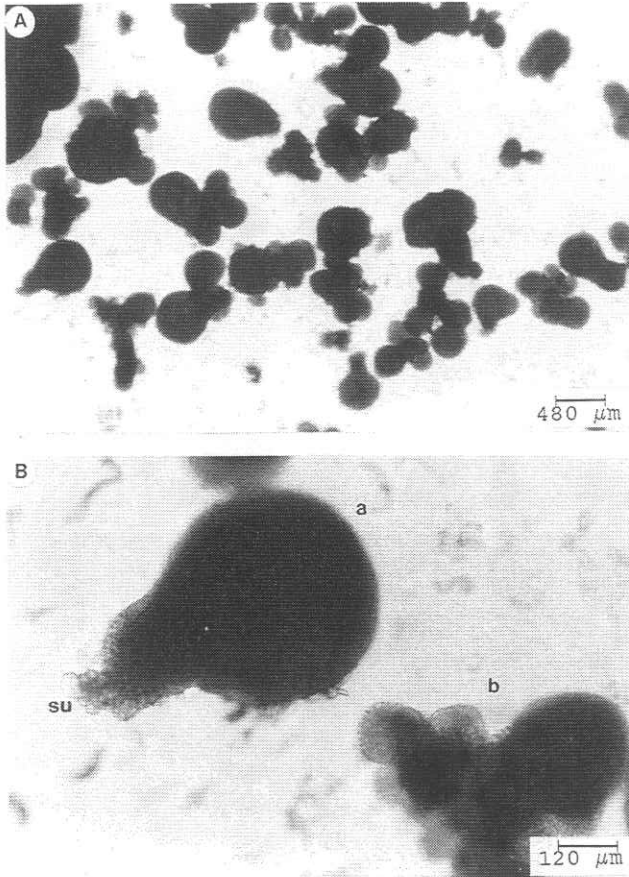
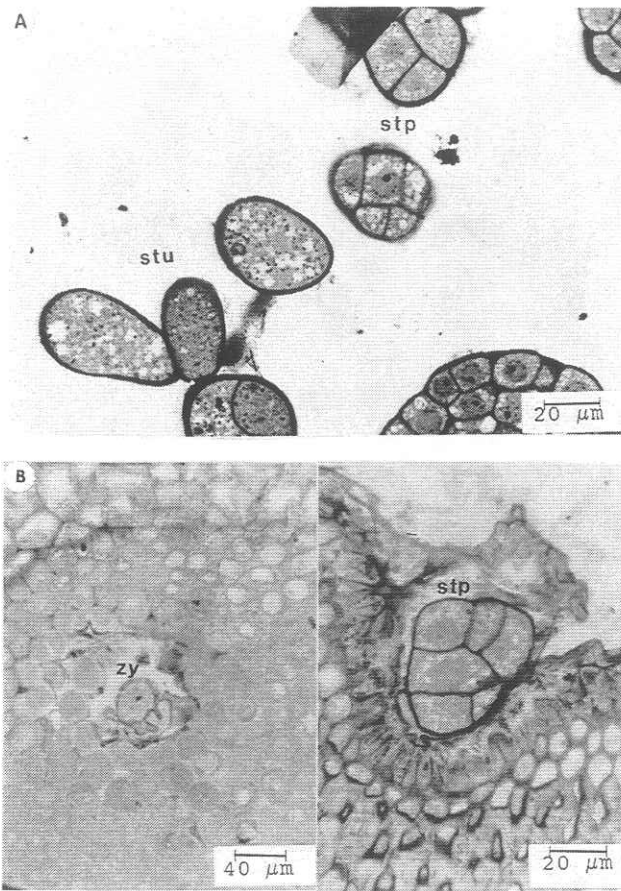


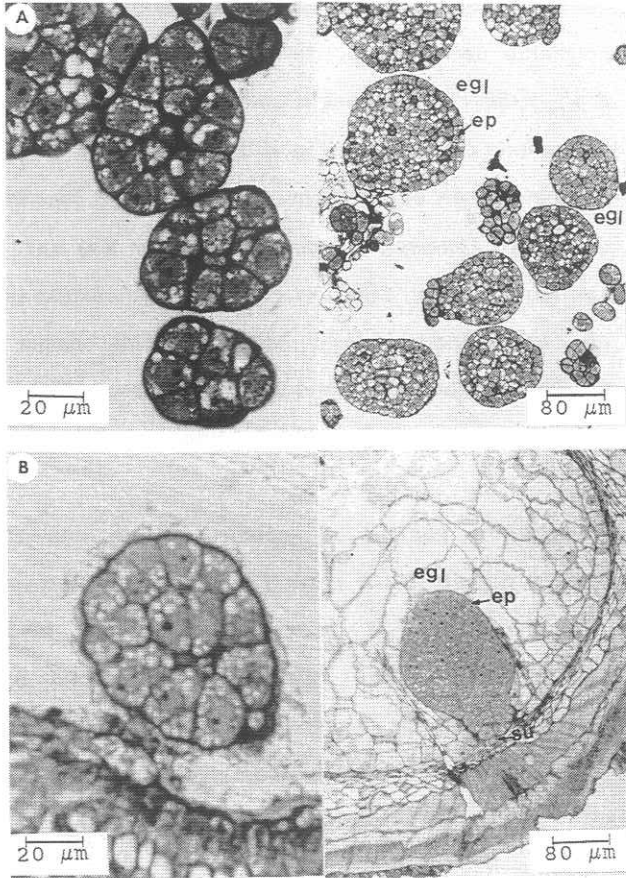
Fig. 45. Vue microscopique à l'état frais d'une culture en phase de régénération.

- A. Production de nombreux embryons somatiques au stade globulaire.  
 B. Détail montrant un embryon somatique globulaire isolé (a) avec un suspenseur (su) et un amas d'embryons somatiques globulaires (b).



**Fig. 46.** Formation d'embryons globulaires à partir de cellules isolées.

- A.** Premières divisions proembryonnaires dans l'embryogénèse somatique.  
**B.** Premières divisions proembryonnaires dans l'embryogénèse zygotique.  
 stu: stade unicellulaire; zy: zygote; stp: stade pluricellulaire.

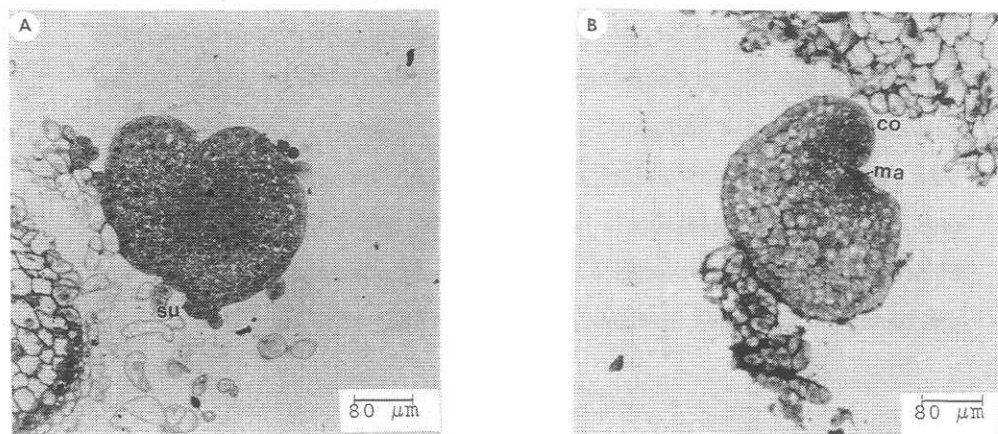


**Fig. 47.** Formation d'embryons globulaires.

- A.** Stades pluricellulaires et globulaires dans l'embryogénèse somatique.  
**B.** Stade pluricellulaire et globulaire dans l'embryogénèse zygotique.  
 egl: embryon globulaire; ep: épiderme; su: suspenseur.

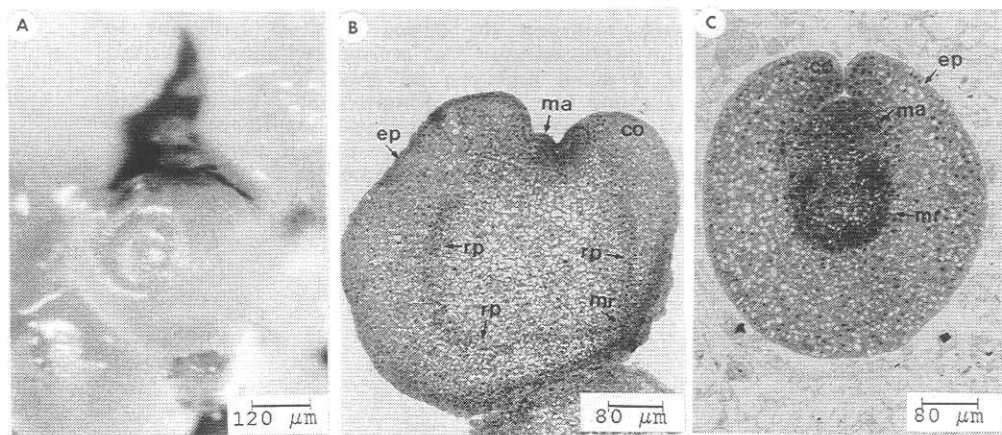
A ces stades proembryogénaires, toutes les cellules conservent encore leurs caractéristiques embryogéniques. On considère l'épidermisation comme une des étapes importantes de l'embryogénèse (Escalant et Teisson, 1988; Schwendiman *et al.*, 1988). La présence d'un suspenseur est aussi observé chez l'embryon somatique du bananier (Fig.45B, 48A) comme observé dans l'embryogénèse somatique en suspensions cellulaires chez *Daucus carota* (McWilliam *et al.*, 1974), *Pennisetum americanum* (Vasil and Vasil, 1981), *Panicum maximum* (Lu and Vasil, 1983) et chez *Musa acuminata* (Escalant, 1990). Dans nos observations, celui-ci devient moins visible lorsque l'embryon grandit. Chez l'embryon somatique, le suspenseur n'est pas aussi développé que chez l'embryon zygote (Zrýd, 1988).

L'évolution des embryons somatiques globulaires vers des embryons somatiques matures a été étudiée à partir des échantillons provenant de l'étape 3 de régénération. Elle commence par une invagination caractéristique. Le début de cette invagination correspond au stade cordiforme (Fig. 48). On décèle à ce stade la présence d'une zone méristématique dense. Ultérieurement, l'embryon cordiforme évolue asymétriquement vers l'embryon cotylédonnaire (Fig. 48B). Le développement asymétrique du pôle apical est une des caractéristiques remarquables de l'embryogénèse chez les monocotylédones (Natesh and Rau, 1984). L'embryon cotylédonnaire avec ouverture cotylédonnaire est illustré par les figures 49A. Sa coupe montre la présence du méristème apical et le réseau procambial reliant ce méristème au pôle racinaire (Fig. 49B). Une image semblable est observée sur une coupe d'un embryon zygote à un stade comparable (Fig. 49C).



**Fig. 48.** Stades cordiformes dans l'embryogénèse somatique.

- A.** Stade cordiforme jeune.  
**B.** Stade cordiforme avancé.  
 ma: méristème apical; co: cotylédon; su: suspenseur.



**Fig. 49.** Stades cotylédonnaires de l'embryogénèse somatique et zygotique.

- A.** Embryon somatique cotylédonnaire vu sous microscope stéréoscopique.  
**B.** Coupe histologique d'un embryon somatique cotylédonnaire.  
**C.** coupe histologique d'un embryon zygotique cotylédonnaire au niveau de la gémule. co: cotylédon; ep: épiderme; ma: méristème apical; mr: méristème racinaire; rp: réseau procambial.

Haccius et Philip (1979) ont réalisé des observations similaires chez l'embryon zygotique de *Cocos nucifera* (Fig. 50). Ils démontrent que l'aspect assymétrique typique de l'embryon des monocotylédones n'est pas toujours bien traduit à cause de l'orientation de la coupe. L'embryon somatique avec une ouverture cotylédonnaire comme celle décrit ici ressemble aux embryons somatiques obtenus à partir des embryons zygotiques immatures des bananiers sauvages (Escalant et Teisson, 1988, 1989).

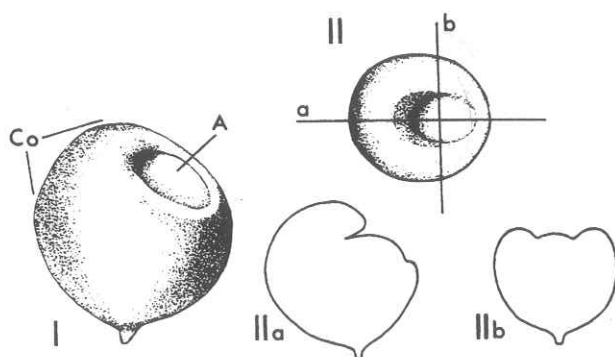
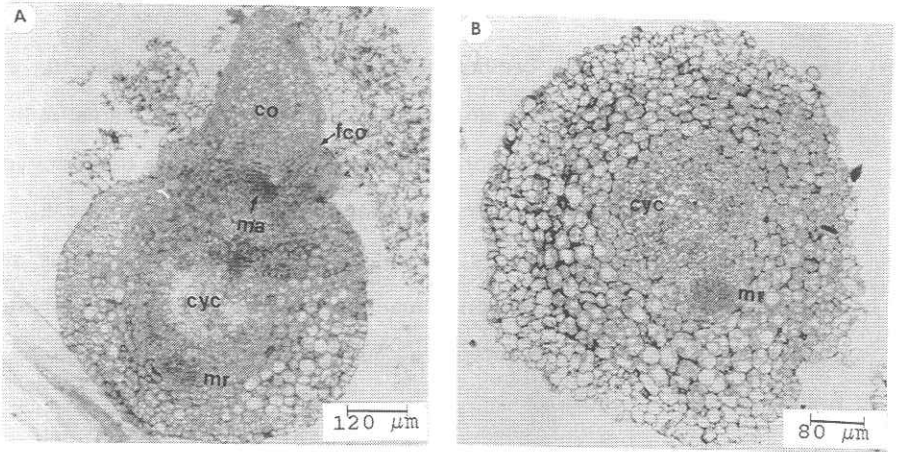


Fig. 50. I. Un jeune embryon de *Cocos nucifera* montrant le primordium cotylédonnaire (co) entourant l'apex caulinaire (A) (x60); II jeune embryon montrant les plans a et b suivant lesquels les coupes longitudinales peuvent être effectuées pour obtenir les configurations IIa et IIb, qui démontrent comment l'embryon du palmier peut être mal décrit comme possédant deux primordia cotylédonnaires (Haccius and Philip, 1979).

Les stades matures de l'embryogénèse sont caractérisés par un pôle caulinaire et racinaire relié par un réseau vasculaire dans une même unité de structure (Fig. 51 à 53). Suivant les milieux, la morphologie des embryons somatiques sont variables comme le montrent les figures 51 et 52. La position du méristème racinaire autour du cylindre central apparaît plus éloigné du centre chez l'embryon somatique (Fig. 51B) que chez l'embryon zygotique (Fig. 53D). Cette différence peut être attribuée aux conditions de culture *in vitro*.

La germination de l'embryon somatique est décrite par les figures 54A et 54B. Elle commence par l'émission de la gémule dont l'évolution aboutit à la formation d'une plantule complète comprenant un apex caulinaire et une ébauche racinaire comparable à la germination de l'embryon zygotique isolé de *M. balbisiana* en culture *in vitro* (Fig. 54C) (Afele, 1986). L'embryon zygotique de bananier, outre le méristème caulinaire et racinaire, est caractérisé par la présence d'un haustorium (Fig. 53 A, B). Cependant, chez l'embryon somatique, un tel haustorium n'a pas été observé. Il en est de même, chez l'embryon somatique du palmier à huile (Shwendiman *et al.*, 1988). Cette absence d'haustorium serait attribuée au manque d'endosperme. *In vitro*, le rôle de l'haustorium serait joué par la partie verte renflée, très vascularisée qui puise les substances nutritives du milieu de culture.

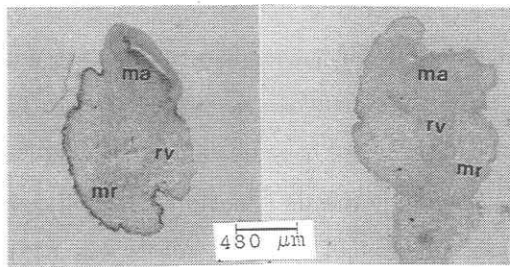


**Fig. 51.** Embryon somatique mature se développant en milieu liquide.

**A.** Coupe longitudinale.

**B.** Coupe transversale au niveau du cylindre central.

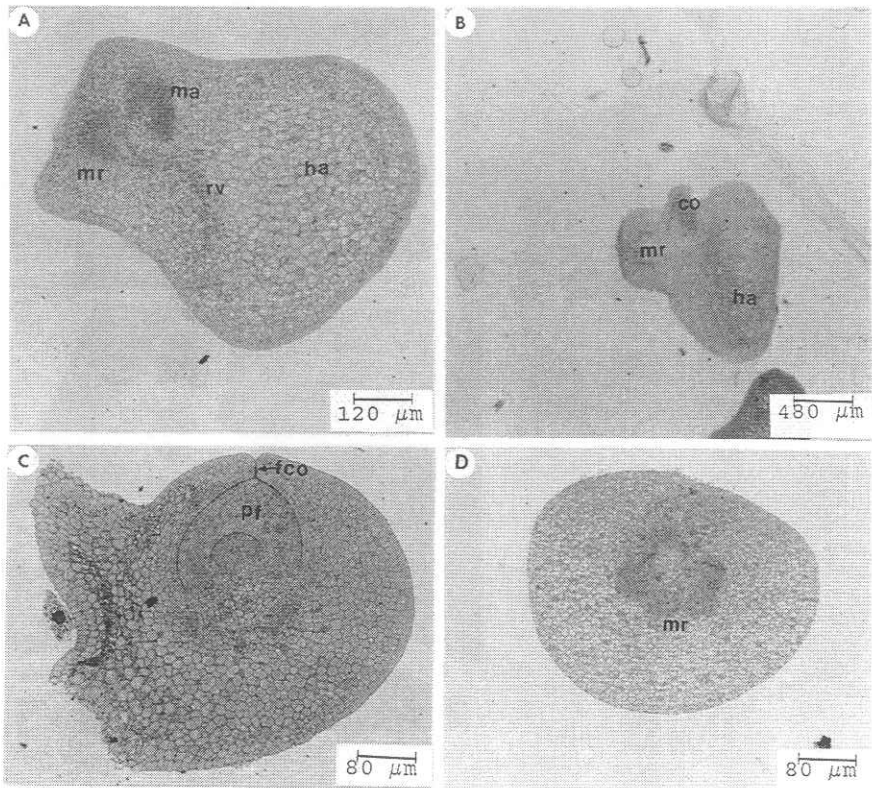
co: cotylédon; cyc: cylindre central; fco: fente cotylédonnaire; ma: méristème apical; mr: méristème racinaire



**Fig. 52.** Embryons somatiques matures se développant sur milieu semi-solide.

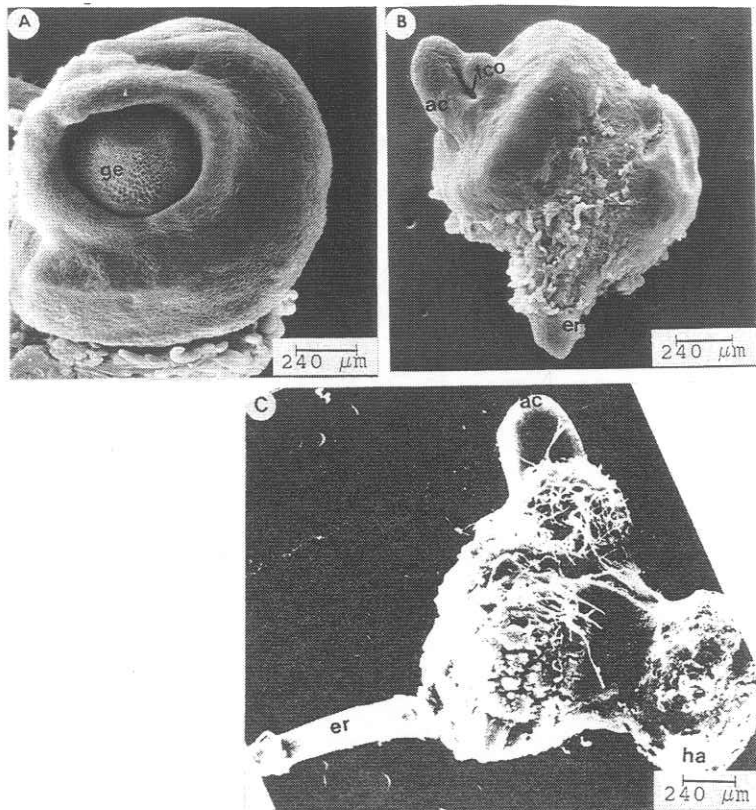
ma: méristème apical; mr: méristème racinaire; rv: réseau vasculaire.





**Fig. 53.** Embryon zygotique mature.

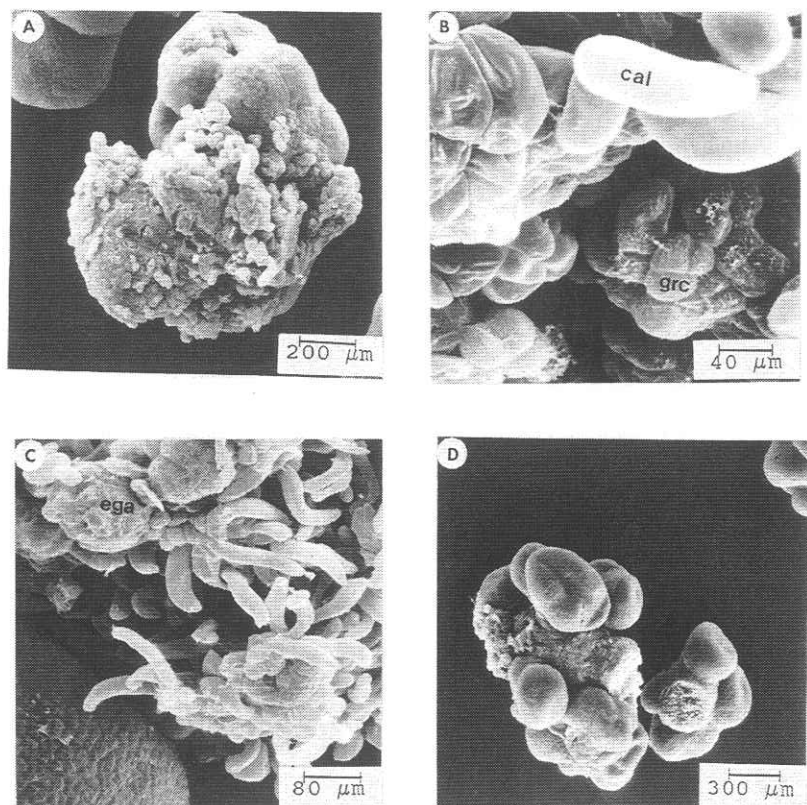
- A, B.** En coupes longitudinales.  
**C.** En coupe transversale au niveau de la gémule.  
**D.** En coupe transversale au niveau du méristème racinaire.  
 fco: fente cotylédonnaire; ha: haustorium; ma: méristème apical;  
 mr: méristème racinaire; pf: primordia foliaires; rv: réseau vasculaire.



**Fig. 54.** Aspect de la germination d'embryon somatique et zygotique vu sous microscope électronique à balayage.

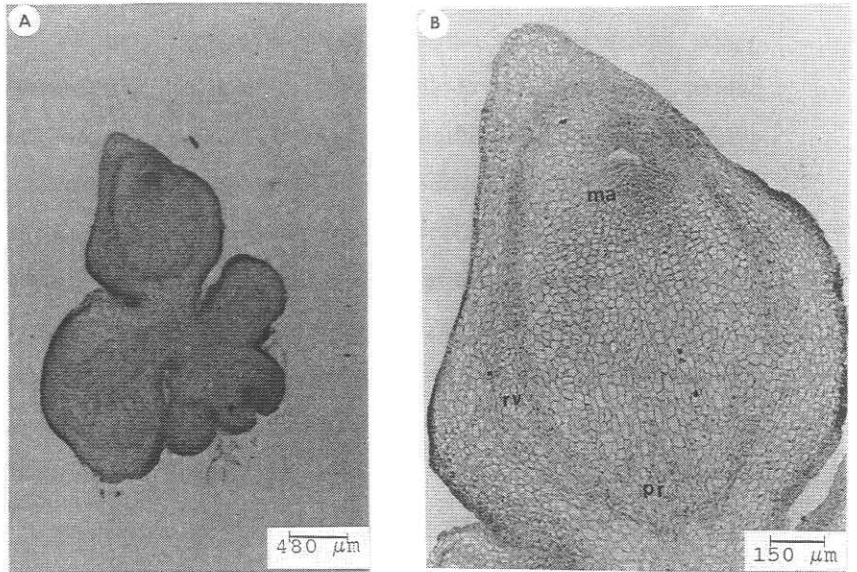
- A, B.** Emission de la gémule chez l'embryon somatique.  
**C.** Emission de la gémule chez l'embryon zygotique (Afele, 1986).  
 ge: gémule; fco: fente cotylédonnaire; ac: apex caulinaire; er: ébauche racinaire; ha: haustorium.

La formation des embryons somatiques adventifs est fréquemment observée. Elle se fait par bourgeonnement des embryons somatiques globulaires aux étapes 1 à 3 et a été étudiée au microscope électronique à balayage. Au début, on observe une désorganisation de l'épiderme (Fig. 55A). Des groupes cellulaires s'individualisent (Fig. 55B) et résultent dans la formation d'embryons somatiques adventifs multiples (Fig. 55C et 55D). Ceux-ci évoluent en paquet vers des stades plus avancés. Leur coupe montre également la présence de méristèmes caulinaire, un réseau de vascularisation fermée convergeant vers le pôle racinaire (Fig. 56A et 56B). D'après Haccius (1978), la vascularisation fermée est l'un des caractères les plus distinctifs de l'embryon somatique par rapport à la néoformation par l'intermédiaire d'un cal. La production d'embryons somatiques adventifs à partir des embryons somatiques est continue dans le milieu liquide sans hormones et constitue un moyen pour produire des plantules sur une longue période. La production d'embryons somatiques adventifs sur milieu sans hormones a aussi été étudiée chez la carotte (Smith and Krikorian, 1988).



**Fig. 55.** Formation d'embryons somatiques adventifs à partir d'embryons somatiques globulaires en désorganisation en milieu liquide de maturation (vue en microscopie électronique à balayage)

- A.** Désorganisation d'un embryon globulaire avec **B:** détail de la surface en désorganisation montrant des cellules allongées lâches (cal) et de petits groupes cellulaires (grc).
- C.** Formation d'embryons globulaires adventifs (ega) à partir des petits groupes cellulaires.
- D.** Groupes d'embryons somatiques globulaires sur un embryon globulaire dédifférencié.



**Fig. 56.** Coupe histologique d'embryons somatiques adventifs.

- A.** Groupes d'embryons aux différents stades de développement  
**B.** Vue détaillée d'un embryon somatique adventif au stade mature.  
 ma: méristème apical; pr: pôle racinaire; rv: réseau vasculaire.

### 3.4. Conclusions

L'origine profonde des cellules embryogéniques se situe dans la région périvasculaire du scalp. Sous l'effet du 2,4-D, certaines cellules de cette région acquièrent des caractéristiques embryogéniques et forment des petites masses proembryogéniques. Celles-ci s'individualisent, se différencient (installation d'une zone pseudo-cambiale) et sont libérées dans le milieu sous forme de globules méristématiques. Ces globules possèdent une structure en 3 couches. La couche externe est à l'origine de nombreuses cellules ovales remplies d'amidon. La couche intermédiaire aux cellules très denses entre en activité et toute la structure devient méristématique (complexe embryogénique). Ce complexe se désintègre en libérant dans le milieu cellules et groupes embryogéniques qui vont constituer des suspensions cellulaires. La couche interne renferme des cellules devenant parachymateuses vers le centre.

L'évolution de suspensions cellulaires en plantules suit la voie de l'embryogénèse somatique, laquelle comprend, comme l'embryogénèse zygotique, un stade unicellulaire, globulaire, cordiforme et cotylédonnaire.

Dans l'embryogénèse somatique étudiée, on observe aussi la production d'embryons somatiques adventifs.

Le suspenseur est observable aux stades précoces de l'embryogénèse, mais l'haustorium de l'embryon zygotique n'a pas été observé chez l'embryon somatique.

## CHAPITRE IV. INITIATION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES CHEZ D'AUTRES VARIETES

### 4.1. Introduction

Dans les chapitres précédents, la culture de suspensions cellulaires embryogéniques a été décrite chez cv. Bluggoe (ABB). Ce cultivar est caractérisé par une forte prolifération *in vitro*, laquelle présente des bourgeons blancs en amas compacts en forme de choux-fleur.

Des études effectuées sur la prolifération du bananier *in vitro* ont montré que le taux de prolifération est très variable suivant les cultivars (Vuylsteke and De Langhe, 1985; Banerjee et al. 1986; Cronauer and Krikorian, 1986; Vuylsteke et al., 1991). La prolifération se fait sur un milieu à 1  $\mu\text{M}$  AIA et 10  $\mu\text{M}$  BAP. Des études effectuées sur la production de globules méristématiques ont montré que tous les cultivars peuvent en produire quoique de façon très variable (Sannasgala, 1989).

Cette étude qui a pour but d'obtenir des suspensions cellulaires embryogéniques chez des variétés autres que Bluggoe va mettre en évidence:

- l'effet de la concentration de 100  $\mu\text{M}$  BAP sur la prolifération et
- l'effet de la prolifération sur 100  $\mu\text{M}$  BAP sur l'initiation de suspensions cellulaires. On s'attend à augmenter le taux de prolifération et à améliorer ainsi la qualité du matériel de départ afin d'obtenir des suspensions cellulaires chez un plus grand nombre de cultivars après un délai plus réduit.

## 4.2. Matériel et méthodes

Le matériel de cette étude est constitué de 13 variétés. Celles-ci représentent la variabilité dans le genre *Musa*. Leur liste est présentée au tableau 5.

### 4.2.1. Effet de la concentration de 100 $\mu\text{M}$ BAP sur la prolifération

Des bourgeons en prolifération, au début sur 10  $\mu\text{M}$  BAP, ont été repiqués sur 10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  BAP. Après une première observation après 3 semaines, des subcultures successives ont été effectuées à intervalle de 3 semaines sur 100  $\mu\text{M}$  BAP. Au total 5 subcultures ont été effectuées. Les observations portent sur:

- l'aspect des bourgeons (nombreux petits bourgeons blancs, gonflement du pseudo-bulbe, nécrose),
- le nombre de bourgeons.

Pour les variétés hautement proliférantes, compte tenu de la taille très petite de ces bourgeons, le chiffre 30 a été considéré comme maximum .

### 4.2.2. Effet de la prolifération sur 100 $\mu\text{M}$ BAP sur l'initiation de suspensions cellulaires

Pour initier des nouvelles suspensions, des explants (scalps) ont été prélevés sur des cultures proliférées sur 100  $\mu\text{M}$  BAP 2 semaines après la dernière subculture. Les scalps ont été inoculés dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 20 ml de milieu à 1/2 MS, 5  $\mu\text{M}$  2,4-D et 1  $\mu\text{M}$  zéatine. 5 erlenmeyers ont été utilisés par cultivar. Au total 3 répétitions ont été effectuées. Les conditions de culture ont été celles décrites au chapitre II, au point 2.2.2.1. Les observations effectuées ont été:



- le comptage de nombre de globules méristématiques produits en 8 semaines,
- l'état de noircissement, observations qualitatives quantifiées par un système de bonification de 0-5; Le chiffre 0 correspondait, à l'absence de noircissement et le chiffre 5, au noircissement le plus fort
- la date de l'apparition de groupes embryogéniques. Les groupes embryogéniques étaient observés directement à l'état frais au microscope à fluorescence après l'application du FDA.

Les suspensions initiées ont été maintenues et régénérées comme décrit au chapitre II.

### 4.3. Résultats et discussion

#### 4.3.1. Effet de la concentration de 100 $\mu\text{M}$ BAP sur la prolifération

Les résultats des observations de la prolifération sur 10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  BAP sont présentés dans le tableau 5 et illustrés par la figure 57A. Ils montrent que l'augmentation de la concentration de BAP augmente le taux de prolifération chez toutes les variétés étudiées. Chez les cultivars Bluggoe et Saba où la prolifération est déjà satisfaisante à 10  $\mu\text{M}$ , cette augmentation n'est pas très importante.

Tableau 5. Nombre de bourgeons produits à 10  $\mu$ M et 100  $\mu$ M BAP

N°	Génot.	Cultivars	JAS (1)		10 $\mu$ M BAP (MP1)			100 $\mu$ M BAP (MP2)			Remarques
			N°(2)	Moy.	St.D	Remarques	N°(2)	Moy.	St.D		
1	AA	M.ac. burmanicoides	77	5	3,2	1,8	plantules+racines	4	8,0	3,5	bourg.
2	BB	M.balbisiana (Tani)	77	4	7,3	4,1	plantules+racines	6	20,2	8,2	petits bourg.
3	AB	Safet Velchi	77	4	1,4	0,9	plantules+racines	8	27,8	8,4	petits bourg.
4	AAB	Figue pomme géante	77	-	-	-	-	5	14,0	7,2	gross bourg.
5	AAB	Mysore	77	3	1,0	0	plantules+racines	6	12,2	3,2	bourg.+feuille.
6	AAB	Three Hand Planty	98	2	3,5	0,7	plantules+racines	3	17,3	1,5	bourg.
7	ABB	Bluggoe	97	8	18,6	7,3	petits bourg.+feuille.	-	-	-	-
8	ABB	Gia Hui	97	8	2,8	1,5	plantules+racines	4	10,5	5,2	gross bourg.
9	ABB	Saba	97	8	21,4	11,8	petits bourg.	4	>30	-	petits bourg.
10	ABB	Cardaba	97	8	12,4	11,1	petits bourg.+feuille.	4	>30	-	petits bourg.
11	AAA	Lacatan	98	7	7,1	1,7	plantules+racines	7	7,1	3,5	gross bourg.
12	AAA	Yangambi	97	4	2,5	1,3	plantules+racines	12	24,5	8,2	petits bourg.
13	AAA	Igitsiri	97	7	4,0	2,2	plantules+racines	9	7,6	2,5	gross bourg.

(1) JAS: Jours après subculture

(2) N°: Nombre de tubes observés

MP: Milieu de prolifération

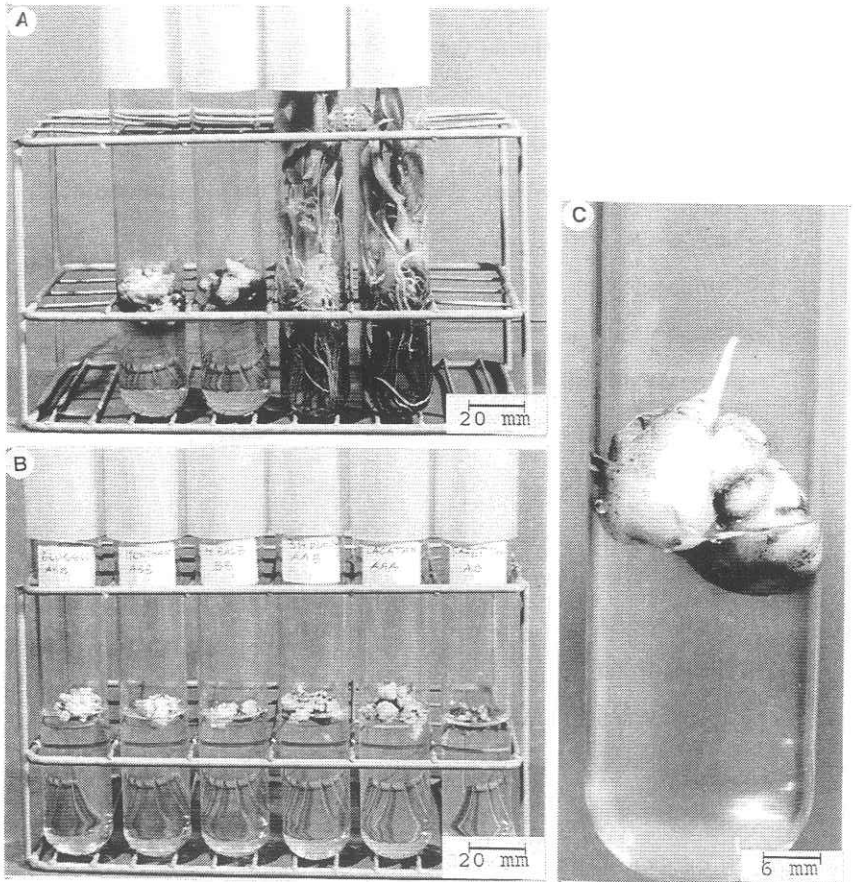
Moy.: Moyenne

St.D: Déviation standard

-: Pas d'observation (Bluggoe prolifère déjà bien à 10  $\mu$ M BAP) ou pas de reprise

bourg.: bourgeons

feuille.: feuilles



**Fig. 57.** Prolifération sur 10 et 100  $\mu\text{M}$  BAP

- A. Prolifération sur 100  $\mu\text{M}$  BAP ( les 2 tubes à gauche) et sur 10  $\mu\text{M}$  BAP (les 2 tubes à droite) chez cv. Igitsiri (AAA).
- B. Comparaison des aspects de la prolifération sur 100  $\mu\text{M}$  BAP chez 6 cultivars.
- C. Gonflement du pseudo-bulbe, résultat des subcultures sur 100  $\mu\text{M}$  BAP chez cv. Cardaba (ABB).

En tenant compte de l'aspect de bourgeons proliférés sur 100  $\mu$ M BAP, on peut classer les variétés en 2 groupes suivant la ressemblance de leur bourgeons avec celui du cultivar Bluggoe:

A. Ressemblance avec Bluggoe (petits bourgeons blancs en amas compact, en forme de choux-fleur) (Fig. 57B), dans l'ordre décroissant:

- Saba (ABB),
- Cardaba (ABB),
- Musa balbisiana (BB),
- Safet Velchi (AB),
- Three Hand Planty (AAB),
- Yangambi (AAA);

B. Ressemblance avec Lacatan (gros bourgeons verts) (Fig. 57B),

- Igitsiri (AAA),
- Mysore (AAB),
- Figue Pomme Géante (AAB),
- Gia Hui (ABB),
- Musa acuminata burmannicoides (AA).

Ce dernier diffère des 4 précédents par le gonflement des feuilles qui recouvrent les bourgeons. Ces feuilles deviennent albinos contrairement aux autres où elles demeurent vertes.

Le tableau 6 présente le taux de prolifération au cours de 5 subcultures successives sur 100  $\mu$ M BAP.

Tableau 6. Taux de prolifération (1) au cours de 5 subcultures successives chez 13 variétés de bananier (Milieu de prolifération: 1  $\mu$ M AIA et 100  $\mu$ M BAP)(observations à 3 semaines d'intervalle)

Génot.	Cultivars	Subculture 1		Subculture 2		Subculture 3		Subculture 4		Subculture 5		Moy.(3)					
		N	Moy.(2)	St.D	N	Moy.	St.D	N	Moy.	St.D	N		Moy.	St.D			
AA	M.acuminata	8	3,5a	0,6	17	2,4b	0,4	15	3,5a	0,8	9	3,3a	1,1	5	2,3b	0,8	3,0fg
BB	M.balbisiana	7	3,6ab	0,8	11	3,3b	0,7	14	4,2a	0,8	15	4,1a	1,0	13	4,0ab	0,8	3,9c
AB	Safet Velchi	23	3,5a	1,1	24	3,0b	0,7	16	2,8b	0,7	18	1,7c	0,5	14	1,8c	0,5	2,7gh
AAB	Figure Pomme	2	2,0b	0,2	4	2,2ab	0,3	10	3,1a	0,6	18	2,5ab	0,6	1	1,9b	-	2,6h
AAB	Mysore	16	3,0a	0,6	20	3,1a	0,7	19	3,1a	0,5	17	2,0b	0,6	7	2,9a	0,9	2,8gh
AAB	Three H.Planty	14	4,4a	0,9	22	3,8a	0,9	18	3,0b	1,1	19	3,8a	0,8	9	2,7b	0,4	3,6cd
ABB	Blugoe	8	5,1ab	0,7	20	5,4a	0,3	20	4,9ab	0,7	24	4,7b	0,8	13	3,8c	0,9	4,8b
ABB	Gia Hui	10	3,7ab	1,1	22	2,9bc	0,5	16	3,8a	0,9	10	2,7c	0,5	2	2,9bc	0,7	3,2ef
ABB	Saba	16	5,0b	0,9	24	5,5a	0	20	5,4a	0,3	21	4,4c	1,0	24	5,5a	0,1	5,2a
ABB	Cardaba	9	3,9b	0,9	24	4,2b	1,1	19	5,0a	0,8	14	3,7b	1,0	14	2,2c	0,9	3,9c
AAA	Lacatan	12	3,1bc	0,5	20	3,9a	0,8	18	3,4ab	1,2	24	3,1bc	0,7	12	2,5c	0,6	3,3ef
AAA	Yangambi	9	3,9a	0,8	21	3,6ab	0,9	9	2,9bc	0,7	10	2,2c	0,7	6	2,7c	0,7	3,2ef
AAA	Igitsiri	3	1,7b	0,9	8	2,7a	0,7	18	3,4a	0,8	24	3,6a	0,9	21	3,6a	0,9	3,4de

(1): Les calculs ont été effectués sur les données transformées ( $\sqrt{x + 0,5}$ )

(2): Les moyennes sont comparées horizontalement. Les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (LSD 5%).

(3): Les moyennes sont comparées verticalement. Les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (LSD 5%).

Ce tableau montre que le taux de prolifération est variable au sein des mêmes variétés suivant les subcultures. Pour les 5 subcultures, Saba (ABB) a fourni le taux de prolifération le plus élevé, suivi de Bluggoe (ABB), Cardaba (ABB), *M. balbisiana* (BB) et Three Hand Planty (AAB). La Figue Pomme (AAB) a eu le taux de prolifération le moins élevé. En général, le taux de prolifération a diminué vers les dernières subcultures. Chez certaines variétés (Safet Velchi, Figue Pomme, Gia Hui, Cardaba), il a même été difficile de maintenir le stock de départ pour continuer les subcultures. La dégénérescence se manifestait par des gonflements du pseudo-bulbe dont les plus spectaculaires ont été observés chez Gia Hui et chez Cardaba (Fig. 57C).

La diminution du taux de prolifération après plusieurs subcultures a déjà été observée (Bannerjee *et al.*, 1986; Vuylsteke *et al.* 1991). La dégénérescence et le gonflement du pseudo-bulbe seraient dus à l'effet cummulé de BAP en concentration élevée.

#### 4.3.2. Effet de la prolifération sur 100 $\mu$ M BAP sur l'initiation de suspensions cellulaires embryogéniques

##### 4.3.2.1. Production de globules méristématiques

Les résultats de ces observations sont résumés par le tableau 7 et 8. Il montre que la production de globules méristématiques a été variable suivant les variétés et suivant les répétitions. Dans l'ensemble, Bluggoe (ABB) et Saba (ABB) ont produit le plus grand nombre de globules et Yangambi Km5 et Igitsiri, le plus petit nombre (Tableau 7). Les premiers ont été caractérisés par un faible degré de noircissement, tandis que les derniers par un degré plus élevé de noircissement (Tableau 8).

Tableau 7. Nombre de globules méristématiques (1) produits au cours de 3 répétitions chez 13 variétés de bananier (milieu: 5  $\mu$ M 2,4-D, 1  $\mu$ M zéatine; observations après 8 semaines)

Cultivars	Répétition 1		Répétition 2		Répétition 3		Moyennes (3)					
	N	Moy.(2) St.D	N	Moy. St.D	N	Moy. St.D	N	Moy. St.D				
M.acuminata	16	3,8ab	20	4,6a	15	2,6b	0,8	52	3,7ef	2,0		
M.balbisiana	20	3,5b	0,9	20	5,3a	1,2	3,3a	2,0	60	4,0ef	1,0	
Safet Velchi	20	7,2b	3,4	20	10,9a	3,9	20	1,1c	0,4	60	6,4bc	5,1
Figue Pomme	20	0,8c	0,4	20	3,6b	3,8	20	8,3a	1,5	60	4,3e	3,9
Mysore	20	8,0a	1,7	20	7,2a	1,9	20	4,9b	1,9	60	6,7bc	2,3
Three H.Planty	20	4,8b	1,4	20	5,5ab	1,7	20	6,6a	2,4	60	5,6cd	1,9
Bluggoe	20	7,6b	1,4	20	11,4a	2,0	20	7,0b	1,7	60	8,7a	2,6
Gia Hui	20	10,6a	2,3	20	8,5b	3,5	20	2,2c	2,4	60	7,1b	4,6
Saba	20	7,6a	2,3	20	8,6a	1,9	20	8,6a	1,5	60	8,3a	1,9
Cardaba	20	6,8a	2,4	20	4,8b	2,3	20	2,0c	1,0	60	4,6ed	1,0
Lacatan	20	2,9b	1,1	20	5,7a	1,4	20	5,4a	2,1	60	4,7ed	2,0
Yangambi	20	4,1a	2,0	20	3,0b	1,2	20	1,9c	1,3	60	3,0fg	1,8
Igitsiri	20	2,6ab	0,6	20	2,9a	0,6	20	2,3b	0,6	60	2,6g	0,9

(1): Les calculs ont été effectués sur les données transformées ( $\sqrt{x + 0,5}$ )

(2): Les moyennes sont comparées horizontalement. Les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (LSD 5%).

(3): Les moyennes sont comparées verticalement. Les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (LSD 5%).

Tableau 8. Degré de noircissement du milieu à 8 semaines au cours de 3 répétitions chez 13 variétés de bananier (milieu de culture: 5  $\mu$ M 2,4-D, 1  $\mu$ M zéatine). Rafraîchissement du milieu effectué après les 5 premières semaines de la culture.

Cultivars	Répétition 1			Répétition 2			Répétition 3			Moyennes	
	N	Moy.	Std	N	Moy.	Std	N	Moy.	Std	N	Std
M.acuminata	16	2,9	1,1	20	4,4	0,7	16	4,0	1,0	52	3,8
M.balbisiana	20	2,1	1,0	20	1,4	0,9	20	1,6	0,9	60	1,7
Safet Velchi	20	1,6	0,9	20	2,3	0,9	20	1,7	1,3	60	1,9
Figue Pomme	20	1,6	1,2	20	1,1	1,3	20	2,6	1,5	60	1,8
Mysore	20	1,3	0,6	20	1,7	0,8	20	1,8	1,3	60	1,6
Three H.Planty	20	3,6	1,1	20	2,6	1,1	20	2,6	1,4	60	2,9
Bluggoe	20	0,1	0,3	20	0,1	0,2	20	0,2	0,4	60	0,1
Gia Hui	20	1,4	0,5	20	1,8	0,7	20	2,0	1,3	60	1,7
Saba	20	0,6	0,5	20	0,0	0,0	20	1,1	1,0	60	0,5
Cardaba	20	0,7	0,6	20	0,5	0,8	20	1,5	1,0	60	0,8
Lacatan	20	1,8	1,5	20	1,2	1,2	20	1,1	1,1	60	1,3
Yangambi	20	2,7	0,9	20	3,9	1,1	20	2,2	1,7	60	2,9
Igitsiri	20	2,1	1,3	20	2,9	0,6	20	2,6	0,6	60	2,4



En général, la production de globules méristématiques a été plus faible à la dernière répétition. Ceci serait en relation avec l'établissement de la dégénérescence du tissu au cours des subcultures successives.

En considérant les résultats du tableau 5 et 7 nous pouvons observer qu'il n'existe pas de corrélation entre le taux de prolifération et le nombre de globules méristématiques. Cependant, il est à noter que les globules méristématiques produits ne sont pas de même grandeur. Qualitativement, on peut les classer en 4 groupes au départ (3-8 semaines):

-globules généralement petits (0,2-2 mm de diamètre) (Fig. 58A):

Safet Velchi, Mysore et Gia Hui;

-globules de grandeur moyenne (0,2-3 mm) (Fig. 58B):

Pomme, Three Hand Planty, Lacatan, Yangambi Km 5, Igitsiri;

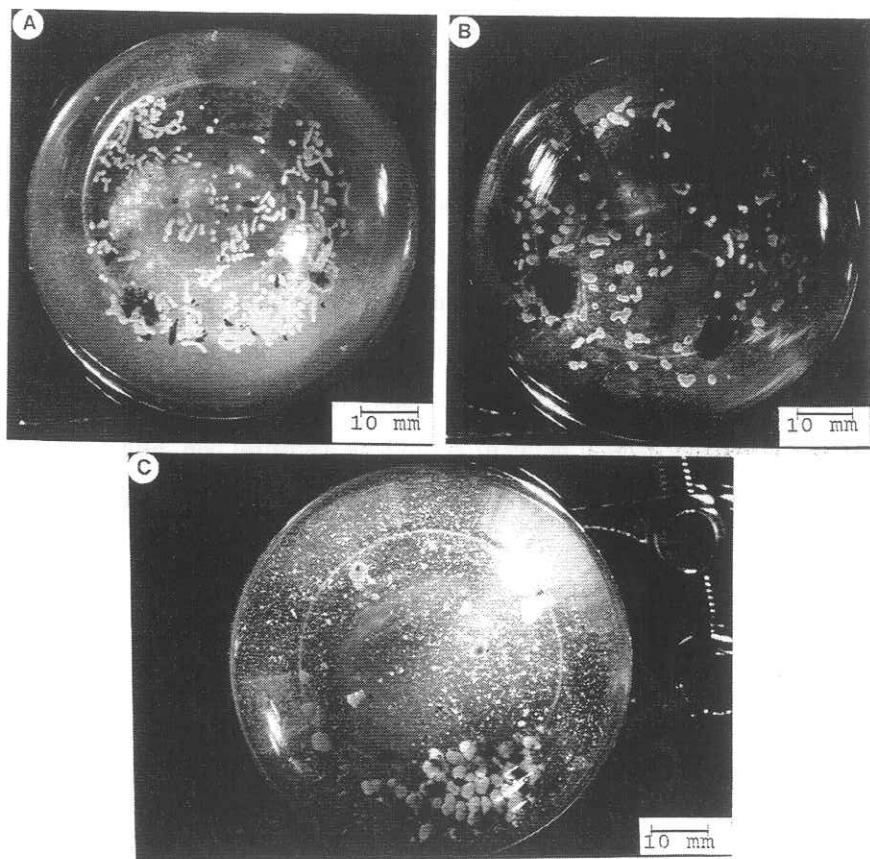
-globules généralement grands (0,2-5 mm) (Fig. 58C):

*Musa balbisiana*, Bluggoe, Saba, Cardaba;

-globules grands et compacts (0,2-5 mm): *Musa acuminata*.

La majorité des ABB ont été les meilleurs pour la production de globules. Une observation semblable a été faite par Sannasgala (1989). Cet auteur a suggéré que la présence du génome B semble favorable pour la production de globule, mais à côté d'un génome A. Cependant, il paraît important d'insister sur les différences qui existent entre les variétés, même au sein d'un même groupe génomique, telles que les montrent les observations présentés dans ce travail.

L'augmentation de la concentration de BAP de 10 à 100  $\mu$ M BAP semble peu influencer la production de globules, puisque des valeurs semblables ont été obtenus avec 10  $\mu$ M BAP dans les expériences présentés au chapitre II chez Bluggoe.



**Fig. 58.** Comparaison qualitative de la grandeur des globules méristématiques chez 3 cultivars.

- A.** Production de nombreux petits globules méristématiques chez cv. Gia Hui (ABB).
- B.** Production de globules méristématiques de taille moyenne chez cv. Three Hand Planty (AAB).
- C.** Production de globules méristématiques de taille relativement grande chez cv. Bluggoe (ABB).

Dans les paragraphes suivants nous déterminerons si la prolifération sur 100  $\mu$ M BAP permet d'obtenir plus facilement des suspensions cellulaires embryogéniques.

#### 4.3.2. Production de cellules et groupes embryogéniques

La présence de groupes embryogéniques dans les cultures d'initiation de suspensions est présentée dans le tableau 9. Il montre que 4 variétés ont produit de groupes embryogéniques: Bluggoe (ABB) (témoin), Saba (ABB), Cardaba (ABB) et Three Hand Planty (AAB). L'évolution des cultures ayant produit des groupes embryogéniques a été semblable. Ces cultures étaient toujours caractérisées par la présence de globules méristématiques devenant blanc opaque avec un contour irrégulier libérant des cellules et groupes embryogéniques. Le processus de formation et de production de ces groupes a été décrit au chapitre III.

La fréquence de production de groupes embryogéniques a été variable suivant les variétés et suivant les répétitions (20-100%). Bluggoe, Saba et Three Hand Planty ont été les meilleurs (40-100%) pour cette production. La présence la plus précoce de groupes embryogéniques a été observé chez Bluggoe à la 3<sup>e</sup> répétition (76,5 jours en moyenne) et la plus tardive chez Saba (166,3 jours en moyenne). Les répétitions correspondant à des subcultures successives, il semble y avoir une tendance vers la réduction de nombre de jours de la première à la dernière répétition, et, suivant les variétés, une augmentation ou une diminution de la fréquence de production de groupes embryogéniques aux répétitions successives.

Tableau 9. Production des groupes embryogéniques au cours de 3 répétitions en cultures d'initiation (Après 8 mois d'observations)

Genot. Cultivars	Rép. 1		Rép. 2		Rép. 3	
	Jrs après initiation	group.embr. Nr	Jrs après initiation	group.embr. Nr	Jrs après initiation	group.embr. Nr
AA M. acuminata	-	4	-	5	-	4
BB M. balbisiana	-	5	-	5	-	5
AB Safet Velchi	-	5	-	5	-	5
AAB Figue Pomme	-	5	-	5	-	5
AAB Mysore	-	5	-	5	-	5
AAB Three.H.Plan.	129,2	5	112,5	5	85,0	5
ABB Bluggoe	93,8	5	86,0	5	76,5	5
ABB Gia Hui	-	5	-	5	-	5
ABB Saba	166,3	5	136,0	5	89	5
ABB Cardaba	129,0	5	163,0	5	-	5
AAA Lacatan	-	5	-	5	-	5
AAA Yangambi	-	5	230,0*	5	-	5
AAA Igitiri	-	5	-	5	-	5

- : pas de groupes embryogéniques

Jrs : jours

embr : embryogénique

\* : groupes avec cellules renfermant beaucoup d'amidon

Nr : nombre d'erenmeyers par expérience

1\*P4

2\*P4

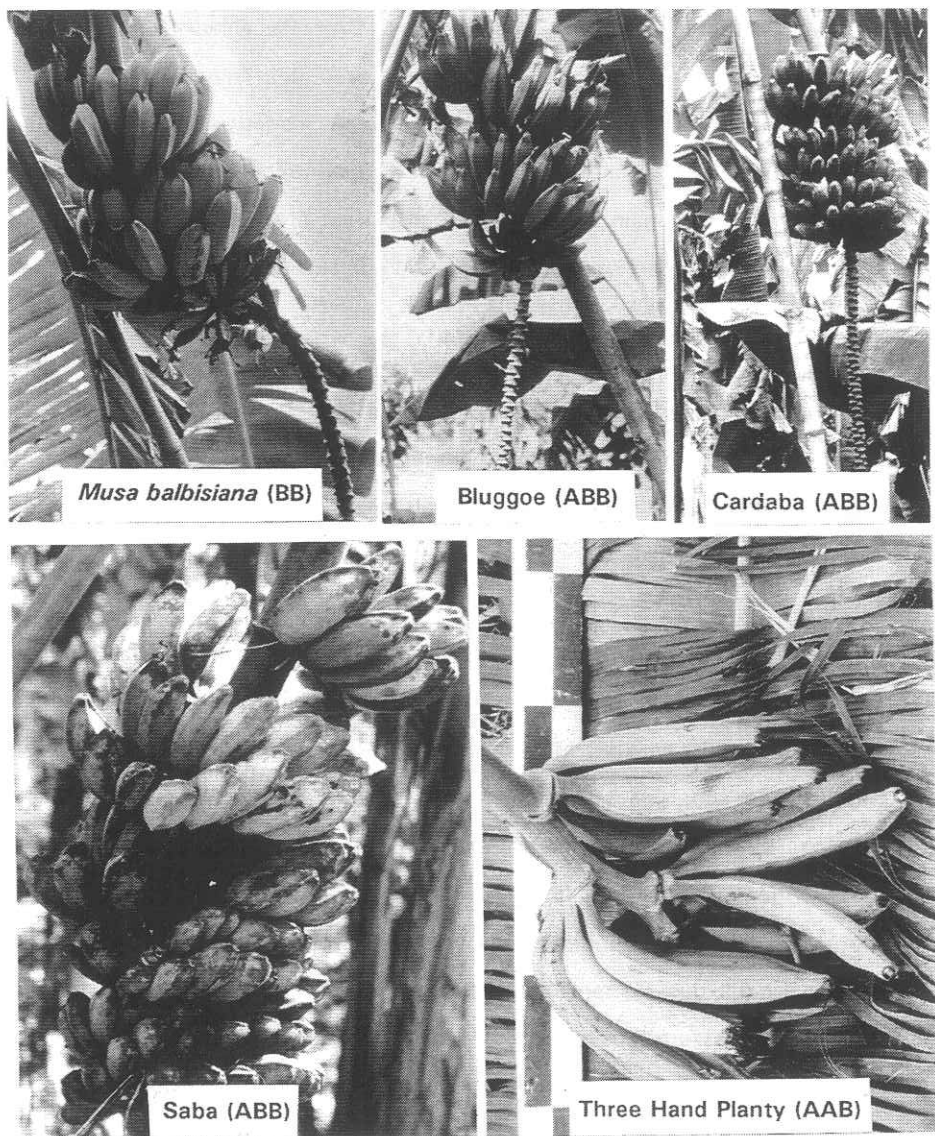
3\*P4

Il ressort de ces observations que, pour les variétés capables de produire des groupes embryogéniques dans nos conditions de travail, il existerait des subcultures plus propices pour initier des suspensions. On pourrait les fixer à 2 subcultures de prolifération sur 100  $\mu$ M BAP. Par ailleurs, l'obtention de groupes embryogéniques en suspensions avec des fréquences de 100% dans les meilleurs cas entre 10 à 18 semaines constitue une amélioration par rapport aux situations décrites au chapitre III (0-60% en 16-24 semaines, soit un gain de 6 semaines. Ceci est à attribuer à la préparation du matériel de départ par une prolifération sur 100  $\mu$ M BAP.

*Musa balbisiana* avait produit une suspension lors d'une initiation précédente. Dans ces expériences, il n'a pas produit des suspensions cellulaires. Le type de globules méristématiques qu'il produit ressemble le plus à ceux de Bluggoe, mais apparaît plus compact et est difficilement relâché dans le milieu.

Yangambi (AAA), a produit après 230 jours (8 mois) et dans 20% de cas à la 2<sup>ème</sup> répétition, une suspension cellulaire capable d'être maintenue. Mais, cette suspension renferme des agrégats dont les cellules, pourtant petites, ne sont pas très denses mais très riches en réserves d'amidon. Quant aux autres variétés, elles n'ont pas produit des groupes embryogéniques dans les huit mois de leur observation. Leur comportement en milieu de culture d'initiation est variable et différents de ceux de variétés ayant produit des suspensions embryogéniques. Ces variétés ne produiront facilement des suspensions cellulaires embryogéniques dans les conditions décrites dans ce travail. Les caractéristiques des régimes de 5 variétés des bananier ayant produit des suspensions cellulaires embryogéniques sont illustrées par la figure 59. Celle-ci montre que ces variétés sont bien différentes les unes des autres. Ces résultats montrent que des nombreuses

autres variétés pourraient produire des suspensions cellulaires embryogéniques dans ces conditions, mais il faudrait pour cela les passer au crible.



**Fig. 59.** Régimes de 5 variétés de bananier ayant produit des suspensions cellulaires embryogéniques (photos prises sur la collection de l'IITA, fournies par R. Swennen et D. Vuylsteke)

#### 4.3.3. Régénération de suspensions cellulaires

Les nouvelles suspensions ont été régénérées en suivant les mêmes étapes que celles utilisées pour Bluggoe. Le taux de régénération a été de 54,4% chez *M. balbisiana* (nombre de structures comptées = N = 465), 38,1% chez Three Hand Planty (N = 690), 32,9% chez Saba (N = 368) et 17,9% chez Cardaba (N = 905). Chez Three Hand Planty, après la germination, une sécrétion brune-noire envahit la culture et inhibe le développement ultérieur de la plantule en milieu semi-solide sans hormone. L'utilisation d'un milieu semi-solide à 1  $\mu$ M AIA et 1  $\mu$ M BAP avant le passage sur le milieu sans hormone permet de stimuler les racines, ce qui facilite le développement des plantules.

Pour avoir les premières observations sur la variation somaclonale chez les plantes issues des embryons somatiques chez les 3 cultivars précités, 55 plantules au total ont été transplantées dans la serre pour leur végétation. Aucun variant n'a été observé jusqu'à ce stade de développement. Mais, des observations complètes en champ sur un plus grand nombre de plantes jusqu'à la floraison sont nécessaires pour tirer des conclusions définitives sur leur variation somaclonale.

#### 4.4. Conclusions

L'augmentation de la concentration à 100  $\mu$ M BAP permet d'augmenter le taux de prolifération. Après 3-4 subcultures on observe une dégénérescence du tissu si l'on pratique des subcultures à intervalle de 3 semaines.

L'initiation de suspensions à partir du matériel proliféré avec 100  $\mu$ M BAP a permis d'obtenir des nouvelles suspensions cellulaires embryogéniques chez 4 variétés avec une fréquence de 20 à 100%, après au minimum 10-18 semaines. Ceci constitue un gain de 6 semaines par rapport à l'initiation décrite au chapitre II qui utilisait une prolifération avec 10  $\mu$ M BAP.

Des nouvelles conditions doivent être envisagées de manière à optimiser cette technique afin d'obtenir des suspensions chez toutes les variétés et en un temps plus court. Au chapitre 5, nous aborderons l'un des aspects de ce problème qui est l'optimisation de la préparation de l'explant de départ.



## CHAPITRE V. ESSAI D'OPTIMALISATION DE LA PREPARATION DE L'EXPLANT POUR L'INITIATION DE SUSPENSIONS EMBRYOGENIQUES

### 5.1. Introduction

L'initiation de suspensions cellulaires présentée dans les chapitres précédents utilise comme matériel des explants de bourgeons méristématiques en prolifération (les scalps). Ces explants sont directement introduits en milieu liquide pour initiation. Le succès de la méthode semble reposer sur la qualité de la prolifération. En effet, les variétés présentant un type de prolifération plus ou moins semblable à celui de Bluggoe (bourgeons multiples en amas compact en forme de choux-fleur) ont les plus facilement produit des suspensions cellulaires embryogéniques.

Il a été montré que l'augmentation de la concentration de BAP à 100  $\mu$ M (chapitre IV) permettait d'augmenter le taux de prolifération chez toutes les variétés étudiées. Elle a aussi permis d'obtenir des suspensions cellulaires à des fréquences plus élevées et après une durée plus courte chez Bluggoe.

L'obtention de suspensions cellulaires chez 5 variétés représentant 2 niveaux de ploïdie et une combinaison de 3 génomes montre que cette méthode peut être utilisée pour un grand nombre de variétés présentant les caractéristiques similaires à ces variétés en culture *in vitro*.

Cependant, compte tenu du fait que les différents bananiers répondent de même manière aux mêmes conditions de culture et qu'il faille initier des

suspensions cellulaires chez tous les cultivars importants en un temps court, une optimisation de la préparation du matériel du départ (culture de prolifération des bourgeons méristématiques) doit être envisagée.

Dans ce chapitre seront présentées les études effectuées sur l'effet de la zéatine et du 2,4-D en milieu de prolifération ainsi que les initiations effectuées en présence d'une plus forte concentration de 2,4-D à partir du matériel ainsi traité. Les objectifs étaient d'obtenir un matériel de départ de meilleure qualité par une meilleure prolifération et l'induction plus rapide de l'embryogénèse à l'intérieur du tissu devra servir au prélèvement de l'explant pour l'initiation de suspensions cellulaires.

Le choix de la zéatine a été justifié par le fait qu'elle est une cytokinine naturelle très active et qu'elle a été meilleure que BAP dans la production de globules méristématiques à partir de scalps (chapitre II). Celui du 2,4-D se justifie par son rôle dans l'induction de l'embryogénèse somatique. L'hypothèse émise à partir des résultats montrant le processus de la formation de cellules embryogéniques (chapitre III) sous l'effet du 2,4-D est schématisée par la figure 60. Elle suggère que, si l'on incorporait le plus tôt possible le 2,4-D dans les différents milieux (au besoin à une forte concentration), on produirait directement les cellules et groupes embryogéniques au lieu de passer par les globules méristématiques considérés ici comme une déviation. Ceci permettrait de réduire la durée de l'initiation.

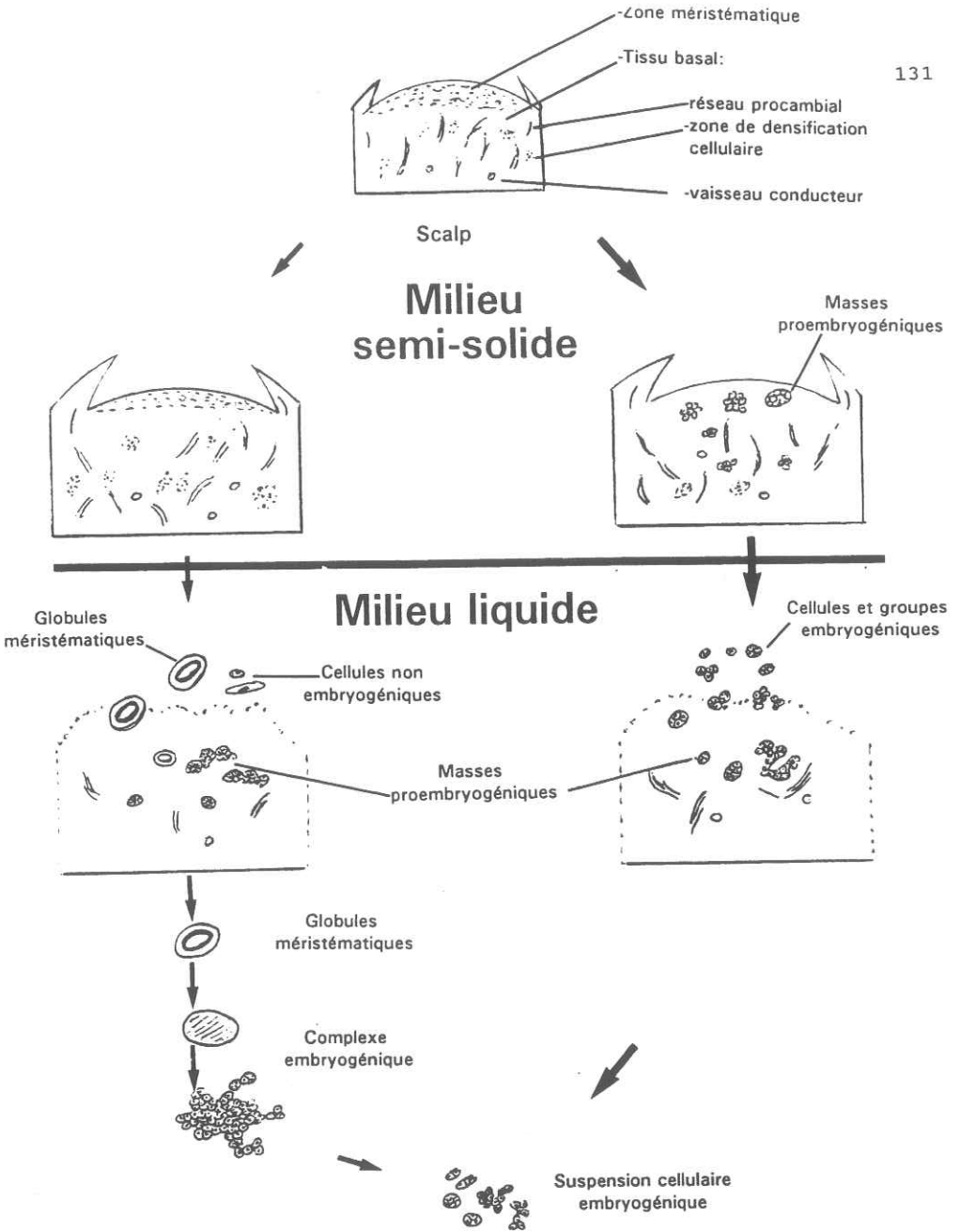


Fig. 60. Hypothèse pour optimiser la production de suspensions cellulaires embryogéniques.

→ : procédure habituelle  
 ➡ : en introduisant 2,4-D déjà en milieu semi-solide (au besoin à une forte concentration)

## 5.2. Matériel et méthodes

### 5.2.1. Effet de la zéatine en milieu de prolifération

Les cultivars suivants ont été choisis comme matériel végétal:

- Bluggoe (ABB) (témoin)
- Three Hand Planty (AAB)
- Lacatan (AAA)

Les bourgeons, au départ sur 1  $\mu\text{M}$  AIA et 100  $\mu\text{M}$  BAP ont été inoculés sur les milieux contenant 1  $\mu\text{M}$  AIA et:

100 BAP (témoin), 10  $\mu\text{M}$  zéatine et 100  $\mu\text{M}$  zéatine

L'incubation a été effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre IV. Les observations ont été effectués après 2-3 semaines sur le nombre de bourgeons et l'aspect de la prolifération. Des échantillons ont été prélevés chez Bluggoe pour des observations histologiques.

### 5.2.2. Effet du 2,4-D en milieu semi-solide

Différents cultivars ont été utilisés au cours de deux séries d'essais: Bluggoe (ABB), Three Hand Planty (AAB) et Lacatan (AAA), dans les premiers essais; Igitsiri (AAA) et Agbagba (AAB), dans les seconds.

Dans la première série d'essais les bourgeons des différents cultivars, au départ sur 1  $\mu\text{M}$  AIA et 100  $\mu\text{M}$  BAP ont été inoculés sur des milieux semi-solides contenant des concentrations de 2,4-D de 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ou 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  BAP ou zéatine. Les observations ont été effectuées sur l'aspect

de la culture après 2 semaines d'incubation. Dans la deuxième série, compte tenu des observations précédentes, les bourgeons ont été inoculés sur des milieux contenant 5  $\mu\text{M}$  2,4-D avec ou sans BAP. Les mêmes observations que précédemment ont été effectuées après 2 à 6 semaines d'incubation. Des échantillons ont aussi été prélevés pour des études histologiques.

### 5.2.3. Initiation en présence de 50 $\mu\text{M}$ 2,4-D

Le cultivar Bluggoe (témoin) provenant des différents traitements en milieu semi-solide a été utilisé pour ces expériences. Les scalps prélevés 2 semaines après la dernière subculture ont été inoculés en milieux liquide d'initiation contenant 5  $\mu\text{M}$  (témoin) ou 50  $\mu\text{M}$  2,4-D. Les conditions de cultures ont été les mêmes que celles décrites au chapitre II. Des observations ont été effectuées sur le nombre de globules méristématiques en huit semaines après l'inoculation des scalps et sur le moment de la production de groupes embryogéniques dans les cultures.

## 5.3. Résultats et discussion

### 5.3.1. Effet de la zéatine en milieu de prolifération

Les résultats de ces observations sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 10. Prolifération sur 1  $\mu$ M AIA avec BAP ou zéatine (observations après 3 semaines)

Milieux	cultivars	N	N° bourgeons + St.D	Aspect de Bourgeons	Appréciation
100 $\mu$ M BAP	Blugoe	12	> 30	-	Très bon Assez bon Mauvais
	Three H. Planty	4	14,5	6,9	
	Lacatan	8	10,5	3,5	
10 $\mu$ M zéat	Blugoe	12	> 30	-	Assez bon Mauvais Mauvais
	Three H. Planty	4	8,8	2,2	
	Lacatan	8	6,5	1,6	
100 $\mu$ M zéat	Blugoe	12	> 30	-	Bon Mauvais Mauvais
	Three H. Planty	4	8,3	2,2	
	Lacatan	8	4,6	1,8	

Ces résultats montrent que seul chez *Bluggoe*, on obtient une prolifération de qualité acceptable avec 100  $\mu\text{M}$  zéatine (Fig. 61A). Cette prolifération n'est qualitativement pas meilleure que celle qui est produite par 100  $\mu\text{M}$  BAP. Chez les autres cultivars testés, on obtient un développement de feuilles ou même des feuilles et racines (*Lacatan*) en présence de 10  $\mu\text{M}$  zéatine. A 100  $\mu\text{M}$  zéatine chez ces cultivars, les résultats obtenus ne sont pas non plus satisfaisants (Fig. 61B). Les coupes histologiques effectuées sur ce matériel chez *Bluggoe* ne montrent pas de différences particulières quant à la structure interne du tissu (Fig. 61C et D) comparée à la figure 40 montrant les réseaux procambiaux et les zones de densification cellulaire (chapitre III).

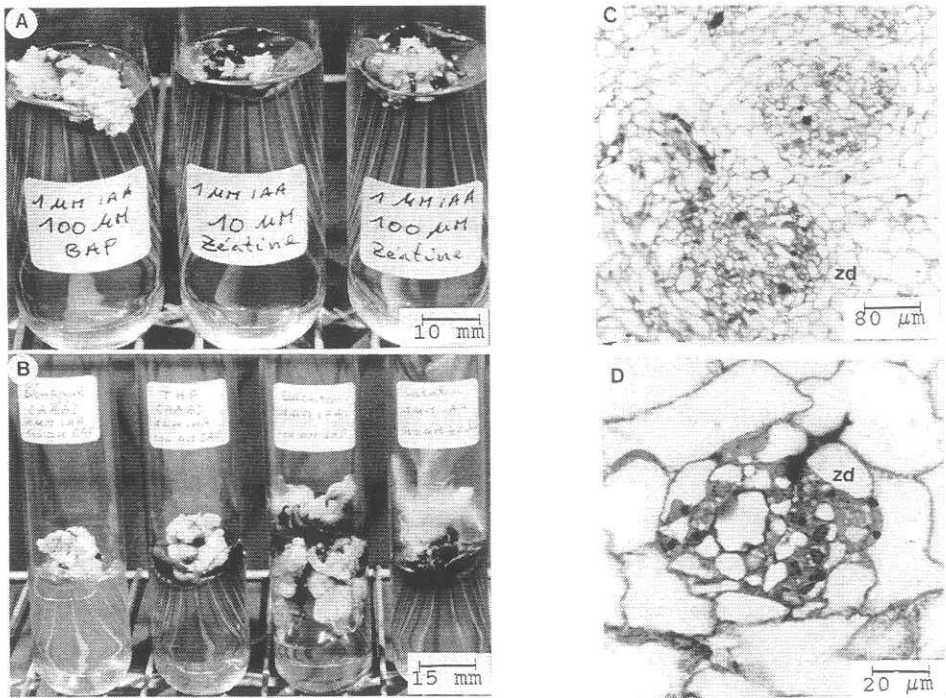


Fig. 61. Effet de zéatine en milieu semi-solide

- A. Prolifération sur un milieu à 10 et 100  $\mu\text{M}$  zéatine comparée à 100  $\mu\text{M}$  BAP chez *Bluggoe* (ABB)
- B. Comparaison de la prolifération sur 100  $\mu\text{M}$  zéatine avec 100  $\mu\text{M}$  BAP chez 3 cultivars
- C. Coupe histologique montrant la densification cellulaire dans la région périvasculaire d'un explant en prolifération sur 100  $\mu\text{M}$  zéatine deux semaines après subculture
- D. Détail de la zone de densification cellulaire.

zd: zone de densification cellulaire

### 5.3.2. Effet du 2,4-D en milieu semi-solide

D'une manière générale, comme l'indiquent les tableaux 11 et 12, la présence du 2,4-D induit la formation de cals. La fréquence et l'abondance du cal augmentent avec la concentration du 2,4-D (Fig. 62A et B). Les meilleurs cals friables sont obtenus chez Bluggoe avec 5  $\mu\text{M}$  2,4-D entre 2-3 semaines. Mais, avec 50  $\mu\text{M}$  2,4-D, le cal brunit avant de dépérir rapidement. Chez Three Hand Planty et Lacatan, les meilleurs cals sont obtenus avec 5  $\mu\text{M}$  2,4-D. A la concentration de 50  $\mu\text{M}$  2,4-D, on assiste chez ces 2 cultivars à la nécrose du tissu.

Les cultures effectuées chez Igitsiri (AAA) et chez Agbagba (AAB) en présence de 5  $\mu\text{M}$  2,4-D avec ou sans BAP (tableau 12) montrent que seule la présence du 2,4-D induit la formation du cal (Fig. 62C et D). Ce cal au départ hydrique et friable (Fig. 62C) devient en partie compact et nodulaire (Fig. 62D et E) dans 52,4% des cas chez Igitsiri et dans 29,9% des cas chez Agbagba. La tendance vers la formation de cals, en général et de cals nodulaire en particulier est plus importante chez Igitsiri que chez Agbagba (96,4 et 52,4% chez Igitsiri contre 88,1 et 27,4% chez Agbagba). Par ailleurs, la formation de cals nodulaires est plus grande en présence de BAP (22,9-43,7% sans BAP contre 33,9-63,9% avec BAP) (Fig. 62 D et E). Ces résultats montrent aussi que les différents cultivars ne répondent pas avec la même intensité à l'action du 2,4-D. Le noircissement en premier phase de culture est également variable, mais a été plus important chez les 2 plantains (Agbagba et Three Hand Planty) que chez Igitsiri.



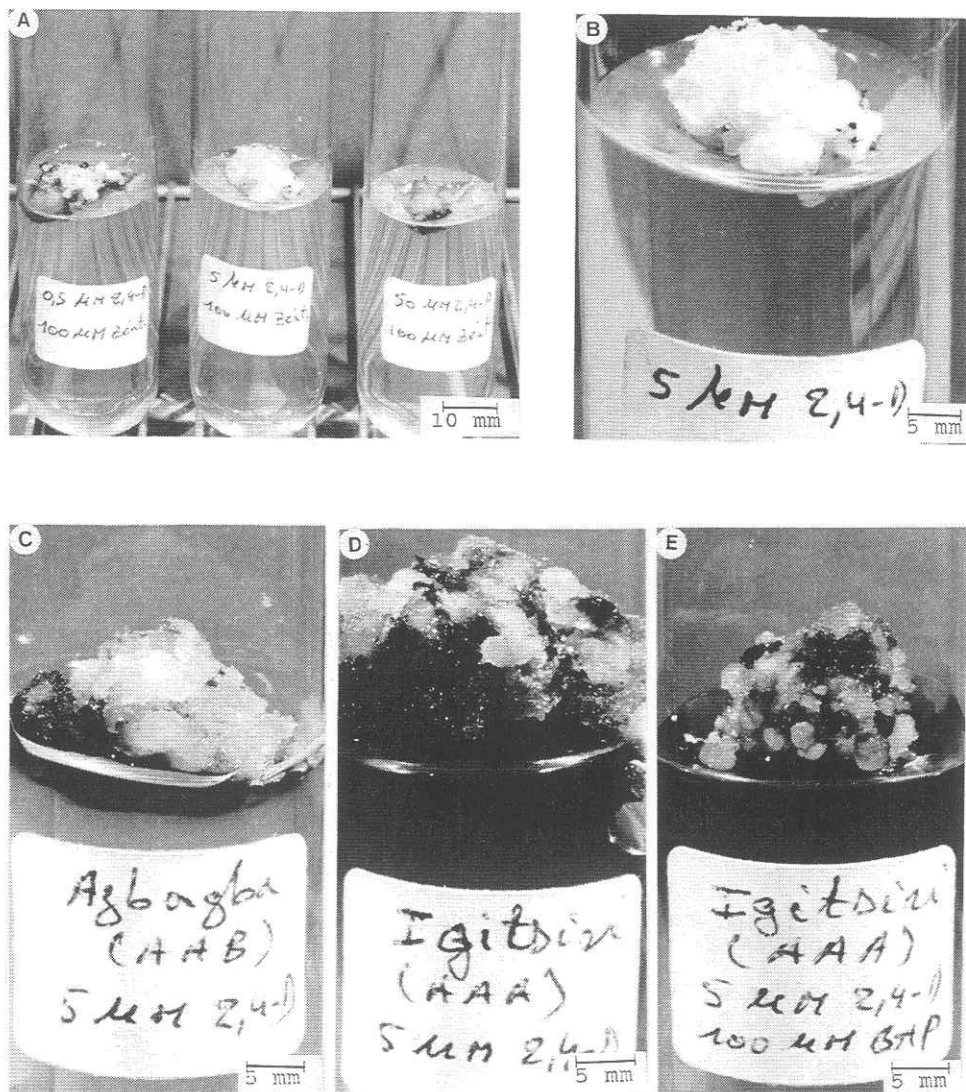
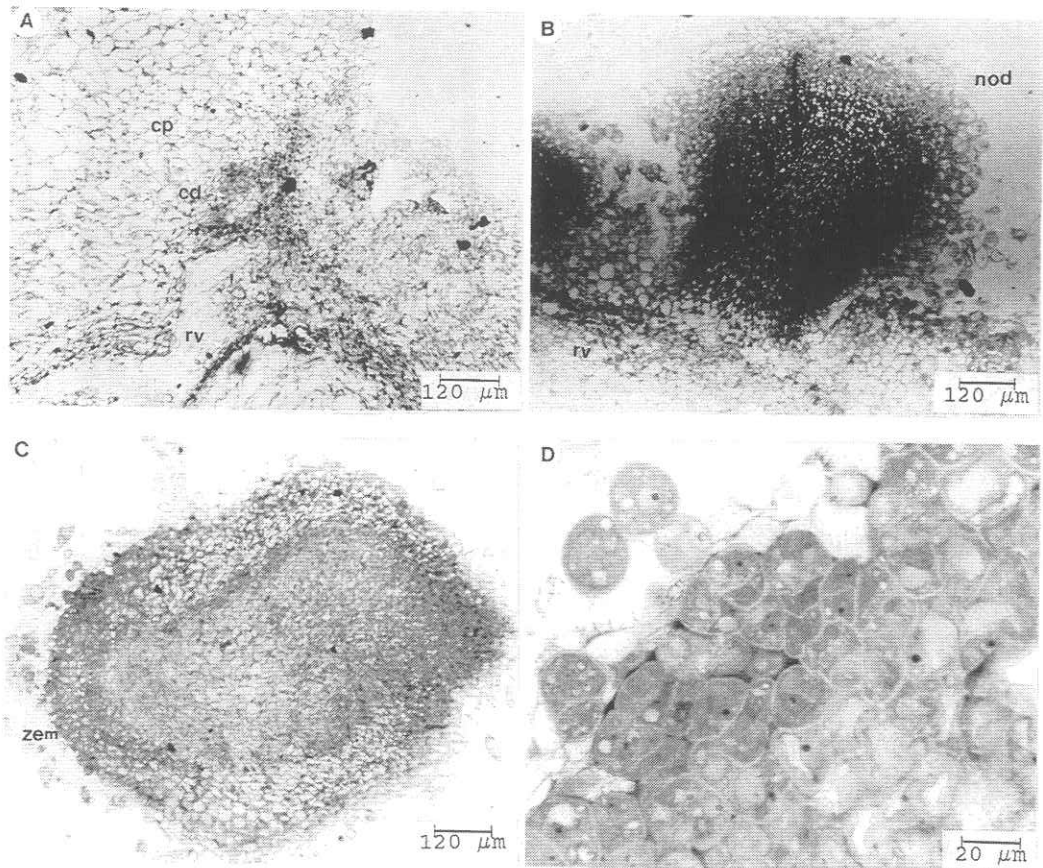


Fig. 62. Induction de la callogénèse chez le bananier sous l'effet du 2,4-D en milieu semi-solide

- A. Effet du 2,4-D en concentrations croissantes sur l'induction du cal chez Bluggoe (ABB)
- B. Détail d'un cal hétérogène (friable et compact) chez Bluggoe (ABB)
- C. Cal hétérogène chez Agbagba (AAB)
- D. Cal hétérogène peu nodulaire en présence du 2,4-D seul et
- E. Cal hétérogène très nodulaire en présence du 2,4-D et de BAP chez Igitsiri (AAA).



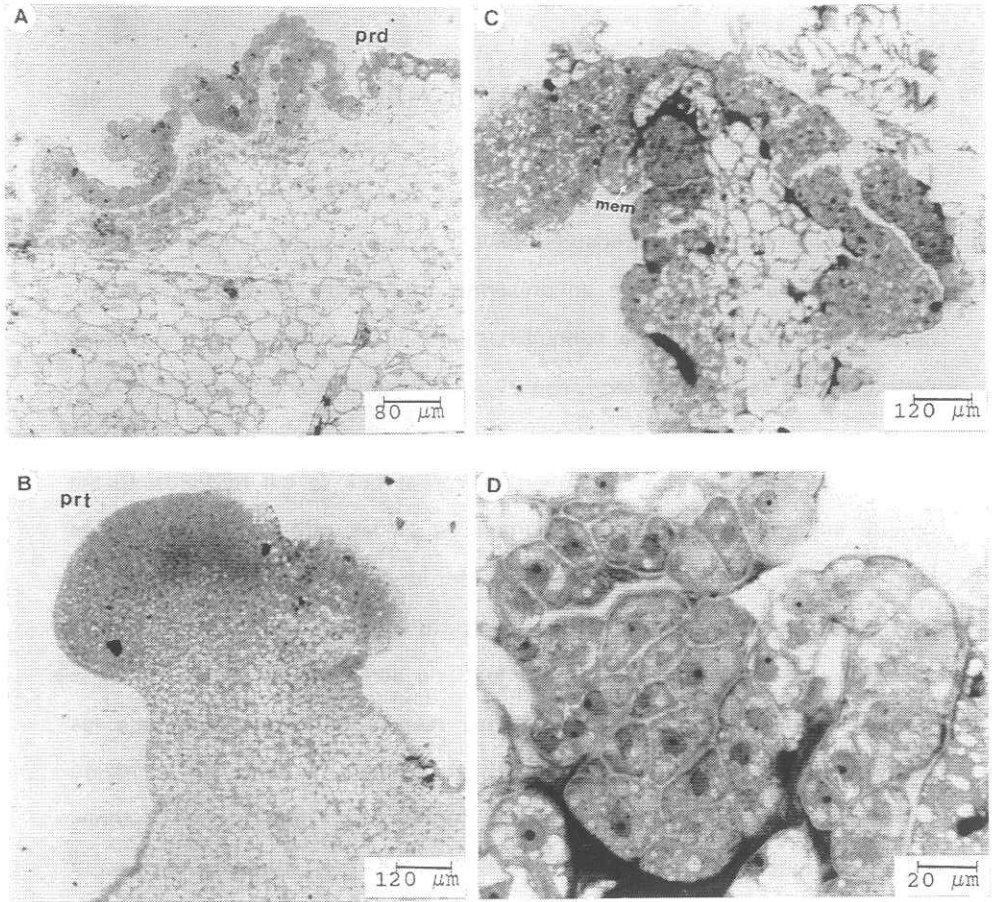
**Fig. 63. Histologie d'un cal avec formation nodulaire à partir de la région périvasculaire**

- A. Coupe d'un cal friable**
- B. Coupe d'un cal nodulaire**
- C. Coupe d'un nodule (globule méristématique) avec zone embryogénique (zem)**
- D. Détail de la zone embryogénique**

cd: cellules denses; cp: cellules parachymateuses; nod: nodule; rv: réseau vasculaire.

Il est utile de noter cependant que la subculture des cals obtenus a été handicapée par le noircissement causé par l'oxydation rapide du tissu. L'oxydation de cal embryogénique a été observée chez le rosier *Rosa hybrida*. Un tissu embryogénique friable pouvait cependant être obtenu à partir de cal embryogénique en présence de ANA et zéatine et maintenu pendant 18 mois grâce aux subcultures régulières en présence d'une forte concentration de 2,4-D (5 mg/l, soit 22,5  $\mu$ M) (Noriega and Söndahl, 1991).

Les coupes histologiques effectuées montrent que le cal hydrique friable obtenu est une structure très désorganisée où les rares zones organisées sont les réseaux vasculaires où subsistent quelques cellules actives (Fig. 63A). Les cals nodulaires sont des structures avec des caractéristiques variables. Les nodules observés sur les cals semblent se former de deux manières différentes. Les uns, avec les mêmes caractéristiques que les globules méristématiques (chapitre III), se forment à partir de la région périvasculaire (Fig. 63B), certains d'entre eux portant des zones embryogéniques vers la surface (Fig. 63C et D). Les autres se forment à partir d'une sorte de protoderme qui se développent à la surface du cal (Fig. 64A). On retrouve chez ce type de cal des protubérances entièrement embryogéniques et épidermisées (Fig. 64B) ou des masses proembryogéniques typiques dans un ensemble de structures fortement désorganisées (Fig. 64C et D). Ces derniers types de cal pourraient constituer un matériel de choix pour l'initiation de suspensions cellulaires embryogéniques.



**Fig. 64.** Histologie d'un cal avec formation nodulaire à partir d'un protoderme à la surface d'un cal

- A.** Surface d'un cal avec protoderme aux cellules denses
- B.** Protubérance embryogénique (prt) se développant à partir du protoderme
- C.** Formations embryogéniques résultant de l'activité du protoderme avec
- D.** Détail des formations proembryogéniques.

prd: protoderme; mem: masses proembryogéniques.

Tableau 11. Effet du 2,4-D en milieu semi-solide (2,4-D + 100  $\mu$ M cytokinine) (observations après 3 semaines)

Milieux	cultivars	N	N°bourgeons	Aspect de Bourgeons	Fréquence de cal (%)
0,5 $\mu$ M + BAP 2,4-D	Blugooe	12	> 30	cal friable	41,7
	Three H. Planty	4	-	tissu gonflé noirci	-
	Lacatan	8	-	tissu gonflé noirci	-
5 $\mu$ M + BAP 2,4-D	Blugooe	12	-	cal friable	75,0
	Three H. Planty	4	-	cal friable	75,0
	Lacatan	8	-	cal friable noirci	87,5
50 $\mu$ M + BAP 2,4-D	Blugooe	12	-	cal friable bruni	83,3
	Three H. Planty	4	-	nécrose	-
	Lacatan	8	-	nécrose	-
0,5 $\mu$ M + zeat. 2,4-D	Blugooe	12	> 30	cal friable	91,7
	Three H. Planty	4	-	tissu gonflé noirci	-
	Lacatan	8	-	tissu gonflé noirci	-
5 $\mu$ M + zeat. 2,4-D	Blugooe	12	-	cal friable	100
	Three H. Planty	4	-	cal friable noirci	75,0
	Lacatan	8	-	cal friable noirci	60,8
50 $\mu$ M + zeat. 2,4-D	Blugooe	12	-	cal friable bruni	100
	Three H. Planty	4	-	nécrose	-
	Lacatan	8	-	nécrose	-

- = pas de prolifération ou pas de donnée

Le rôle des auxines en général et du 2,4-D en particulier dans l'induction de cal est bien connu (Butcher and Ingram, 1976; Gautheret, 1985). A cause de la variabilité génétique qui peut résulter de l'utilisation du 2,4-D, beaucoup de chercheurs lui préfèrent l'ANA ou l'AIA. Mais, chez les plantes à large feuilles, l'utilisation du 2,4-D à 4,5-13,6  $\mu\text{M}$  est la plus fréquente (George and Sherrington, 1984). Le rôle du 2,4-D dans l'induction de l'embryogénèse somatique est aussi bien connu et a été discuté au chapitre II.

L'utilisation du 2,4-D dans ce travail a permis d'obtenir la formation d'un cal nodulaire. Les zones nodulaires du cal demeurent une source potentielle de tissu embryogénique exploitable pour l'initiation de suspensions cellulaires embryogénique. Le tissu embryogénique a été induit non seulement à partir de la région périvasculaire, mais aussi à partir du protoderme qui se forme sur le cal. Ce dernier type semble être un matériel de qualité pour la culture de suspensions cellulaires embryogéniques.

### 5.3.3. Initiation en présence de 50 $\mu\text{M}$ 2,4-D

Les résultats d'observations effectuées après les 8 premières semaines d'initiation sont présentés dans le tableau 13. Ils montrent que les globules méristématiques ont été produits aussi bien en présence de 5 que de 50  $\mu\text{M}$  2,4-D.

Tableau 12. Effet du 2,4-D en milieu de prolifération chez Igitsiri (AAA) et Agbagba (AAB)  
(Observations après 6 semaines)

2,4-D	BAP	Cultivar	N	% cal friable	%cal nodul.	%noirc.
5 $\mu$ M	-	Igitsiri	42	93,8	43,7	-
		Agbagba	44	89,6	22,9	-
5 $\mu$ M	100 $\mu$ M	Igitsiri	36	100,0	63,9	-
		Agbagba	36	86,1	33,9	-
Total		Igitsiri	78	96,4	52,4	5,0
		Agbagba	80	88,1	27,4	28,8

nodul.: nodulaire

noirc.: noircissement

N: nombre de tubes observés

Tableau 13. Production de globules méristématiques (observations à 8 semaines) et groupes embryogéniques (observations à 14 semaines)

Mil. prol.	Mil. init. + 2,4-D	N	Moy. glob./erlen	std	Moy. noirc. du milieu	std	Présence Gem (97 jours)
100 $\mu\text{M}$ BAP	5 $\mu\text{M}$	5	6,9a	0,4	2,8	0,4	+
	50 $\mu\text{M}$	5	1,4g	0,7	0,8	0,4	-
10 $\mu\text{M}$ zéat	5 $\mu\text{M}$	4	3,5cde	0,4	2,0	0,8	+
	50 $\mu\text{M}$	4	1,3g	0,5	0,0	0,0	-
100 $\mu\text{M}$ zéat	5 $\mu\text{M}$	5	6,3ab	2,3	3,0	0,7	+
	50 $\mu\text{M}$	5	1,6efg	0,4	0,8	0,4	-
0,5 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	5	5,6ab	1,9	3,0	0,0	+
2,4-D BAP	50 $\mu\text{M}$	5	2,1efg	1,1	1,2	1,3	-
5 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	5	4,7bcd	1,9	2,8	0,8	+
2,4-D BAP	50 $\mu\text{M}$	5	1,1g	0,6	0,0	0,0	-
50 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	5	5,7ab	2,4	3,3	1,2	-
2,4-D BAP	50 $\mu\text{M}$	5	1,5fg	0,7	0,0	0,0	-
0,5 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	5	5,3abc	0,8	2,8	0,4	+
2,4-D zéat	50 $\mu\text{M}$	5	2,0efg	0,9	2,4	0,5	-
5 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	5	4,8bcd	1,3	1,8	1,0	+
2,4-D zéat	50 $\mu\text{M}$	5	1,4g	0,7	0,4	0,5	-
50 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	5	3,4def	2,3	0,3	0,6	+
2,4-D zéat	50 $\mu\text{M}$	5	1,0g	0,5	0,0	0,0	-

glob: globules méristématiques. Les calculs ont été effectués sur les données transformées ( $\sqrt{x+0,5}$ ). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas différentes (LSD = 5%)

noirc.: noircissement

Gem: groupes embryogéniques

-: pas de groupes embryogéniques (cultures non productives éliminées après les 8 premières semaines)



Par contre, ces résultats ne montrent pas que 50  $\mu\text{M}$  2,4-D peut directement permettre la libération des masses proembryogéniques telle que suggérée par l'hypothèse présentée dans le schéma de la figure 60. Au contraire, en présence de 50  $\mu\text{M}$  2,4-D, la production de globules méristématiques est faible et le tissu noircit et meurt au cours de renouvellement avec le même milieu. La question posée au chapitre III, à savoir, pourquoi certaines masses proembryogéniques se différencient déjà à l'intérieur même du scalp persiste. Ces résultats montrent encore que les scalps, qu'ils proviennent d'un matériel sans ou avec cal, produisent des globules méristématiques. Dans le cas d'un matériel portant un cal, la partie cal noircit et se détache du scalp. Le tissu plus interne restant libre dans le milieu des globules déjà formés sur le milieu semi-solide ou des globules nouvellement produits. Le milieu de prolifération avec AIA et 100  $\mu\text{M}$  BAP a fourni le meilleur matériel si l'on considère la production de globules méristématiques.

Les groupes embryogéniques ont été produits dans 88,9% de traitements avec le milieu d'initiation de suspensions contenant 5  $\mu\text{M}$  2,4-D et 1  $\mu\text{M}$  zéatine après 97 jours (14 semaines) (tableau 13). Les cultures avec 50  $\mu\text{M}$  2,4-D avaient été écartées à la huitième semaine, parce qu'elles n'étaient pas productives. On n'a pas observé une influence particulière de la zéatine ou du 2,4-D utilisés dans le milieu semi-solide dans le temps nécessaire pour la production de groupes embryogéniques.

#### 5.4. Conclusions

L'ensemble de résultats obtenus a montré que la prolifération, en utilisant la zéatine, n'est pas meilleure qu'en utilisant le BAP et que l'inclusion du 2,4-D en milieu semi-solide induit la formation d'un cal friable et nodulaire. L'utilisation de 50  $\mu\text{M}$  2,4-D en milieu d'initiation comme 5  $\mu\text{M}$  2,4-D permet la production de globules méristématiques, mais en quantité nettement plus faible. Cette concentration de 2,4-D peut être considérée comme déjà excessive pour le bananier. Les différents traitements effectués en milieu de prolifération ne permettent pas l'obtention plus rapide de suspensions embryogéniques.

L'obtention d'un cal nodulaire avec des caractéristiques embryogéniques chez différents cultivars et génotypes pourrait offrir des nouvelles perspectives pour l'initiation de suspensions cellulaires chez les cultivars à faible prolifération de bourgeons méristématiques.

## CHAPITRE VI. CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail a eu pour objet la culture de suspensions cellulaires et l'embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.) à partir d'un tissu somatique.

Le matériel utilisé a été un tissu végétatif non embryogénique, le scalp, explant prélevé sur le bourgeon méristématique en prolifération.

La mise au point de la culture de suspensions cellulaires a été effectuée chez cv. Bluggoe, un cultivar hautement proliférant. La culture de suspensions embryogéniques a suivi 3 étapes principales:

1. l'initiation: elle s'est faite en inoculant les scalps prélevés 2 semaines après la dernière subculture dans un milieu liquide à 1/2 MS + 5  $\mu$ M 2,4-D + 1  $\mu$ M zéatine. La zéatine s'est révélée la meilleure pour cette phase de culture et le 2,4-D essentiel pour l'induction de l'embryogénèse somatique.

2. la maintenance de suspensions: elle s'est faite dans le même milieu que l'initiation. Le renouvellement du milieu a été effectué à intervalle de 3-4 semaines. Le 2,4-D s'est avéré important pour une bonne maintenance.

3. la régénération: elle a suivi 4 étapes:

- l'induction de la formation des embryons globulaires dans un milieu sans 2,4-D et sans cytokinine,
- la maturation des embryons somatiques globulaires en présence d'un cytokinine (BAP ou zéatine),

- la germination des embryons somatiques en milieu liquide ou semi-solide en présence de cytokinine et
- le développement des plantules sur un milieu semi-solide sans régulateurs de croissance avant leur transplantation dans le sol.

Les meilleurs résultats de régénération ont été obtenus, en milieu liquide, en présence de 10  $\mu\text{M}$  BAP, et sur milieu semi-solide, en présence de 10  $\mu\text{M}$  BAP ou zéatine après un passage de 2 semaines en milieu de maturation avec 1  $\mu\text{M}$  zéatine.

Le taux de régénération pouvant atteindre 54,4% dans certains traitements en milieu liquide constitue un taux de régénération parmi les meilleurs jusque là obtenus chez le bananier en culture de suspensions cellulaires.

Les plantes issues de l'embryogénèse somatique se sont développées normalement en serre. Les études de la variation somaclonales effectuées sur ces plantes en plein champ n'a mis en évidence que 0,7% de somavariants chez le cv. Bluggoe.

Les études morphologiques et histologiques ont montré que les cellules embryogéniques se forment à l'intérieur du scalp dans les régions périvasculaires. Ces cellules forment des globules méristématiques qui sont libérés dans le milieu. Ceux-ci évoluent en une structure en 3 couches dont l'activité mitotique de la couche intermédiaire avec des cellules denses conduit à la formation d'un complexe embryogénique libérant des cellules et groupes embryogéniques.

L'évolution des cellules embryogéniques en plantules suit la voie de l'embryogénèse somatique, laquelle présente des similitudes très

remarquables avec l'embryogénèse zygotique chez les bananiers diploïdes sauvages. Mais, l'haustorium, présent chez l'embryon zygotique n'a pas été observé chez l'embryon somatique.

La reproductibilité de ce protocole mis au point chez le cv. Bluggoe a été étudiée chez 13 variétés représentant différents génotypes. 5 variétés dont *Musa balbisiana* (BB), Three Hand Planty (AAB), Bluggoe (ABB), Saba (ABB), Cardaba (ABB) ont pu produire des suspensions cellulaires embryogéniques et une variété, Yangambi (AAA), une suspension maintenable au cours de quelques subcultures, mais non embryogénique. Ceci montre qu'un grand nombre de cultivars peuvent produire des suspensions cellulaires embryogéniques, encore faut-il, les rechercher.

Ceci voudrait dire qu'à l'heure actuelle, il n'est pas encore possible de généraliser ce protocole sans modifications pour tous les cultivars de bananier, compte tenu de leur diversité de réactions dans les conditions décrites dans ce travail.

L'utilisation du BAP à 100  $\mu\text{M}$  au lieu de 10  $\mu\text{M}$  en milieu de prolifération a augmenté le taux de prolifération chez tous les cultivars étudiés. Elle a aussi permis d'obtenir des suspensions cellulaires embryogéniques avec une fréquence plus élevée et après une durée plus courte.

L'établissement de suspensions cellulaires embryogéniques a permis de:

- réaliser avec succès des études sur la cryoconservation des suspensions cellulaires de bananier, importante pour la conservation à long terme de germoplasme de bananier (Panis *et al.*, 1990, 1992; Panis, 1991),
- caractériser la croissance des suspensions cellulaires et donc les conditions de subculture chez le bananier par la mesure du volume des cellules tassées (packed cell volume), du poids frais, du poids sec et de la viabilité au TTC (Vloebergh, 1992),

-envisager des recherches visant l'amélioration génétique du bananier par les méthodes biotechnologiques:

- isolement, culture et régénération de protoplastes (Van Wauwe, 1992),
- insertion de plasmides étrangers après traitement des protoplastes par électroporation (Remy, 1992).

L'originalité de ce protocole par rapport aux autres travaux dans ce domaine réside dans le fait que:

- la suspension est établie à partir d'un tissu somatique, d'où la possibilité d'application de ce protocole à toutes les variétés de bananier. En effet, l'initiation de l'embryogénèse à partir d'un tissu d'embryon zygotique (Escalant and Teisson, 1989; Maroquin *et al.*, soumis), quoique plus simple que le présent protocole, parce qu'utilisant un tissu déjà embryogène, est limitée aux rares variétés séminifères.
- la suspension n'est pas établie en commençant par un cal comme c'est le cas chez Novak *et al.* (1989). Le cal a l'inconvénient de conduire à une plus grande variation.
- la régénération elle, non plus, ne passe pas par un stade cal,
- des milieux identiques sont utilisés pour l'initiation et pour la maintenance,
- la régénération peut se dérouler entièrement en milieu liquide et peut atteindre des taux relativement élevés (23,1-54,4%), d'où la possibilité d'automatisation de la culture de suspensions cellulaires en bio-réacteur.
- L'embryogénèse somatique en culture de suspension cellulaire a été étudiée en détail et a été comparée avec les principaux stades de l'embryogénèse zygotique.

Cette procédure est plus simple que celle présentée par Novak *et al.* (1989) où une alternance entre le milieu MS, le milieu de Schenk and Hildebrandt (1972), le milieu à double couche et une succession de 7

étapes sont nécessaires pour la culture et pour une régénération de 1,5-12% à partir de suspensions.

Les recherches futures dans ce domaine devront s'axer sur l'optimisation de l'initiation en vue d'en raccourcir la durée et d'obtenir des suspensions cellulaires embryogéniques chez un plus grand nombre de cultivars. Une meilleure préparation du matériel du départ pourrait vaincre la limitation actuelle de la méthode due à la diversité de réactions des variétés aux mêmes conditions de culture. L'induction de cals hétérogènes présentant des caractéristiques embryogéniques en présence du 2,4-D en milieu semi-solide chez différents cultivars constitue une autre orientation pour l'initiation de suspensions cellulaires chez les cultivars à faible prolifération de bourgeons méristématiques. Les efforts devraient viser davantage les cultivars triploïdes, parthénocarpiques, car ce sont des variétés consommées.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afele, J.C. 1986. Anatomical and morphological studies of isolated *Musa balbisiana* embryos germinating *in vitro*. M.S. Thesis , K.U.Leuven, 84pp.
- Alizadeh, S. and Mantell, S.H. 1991. Early cellular events during direct somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Solanum aviculare* Forst. *Annals of Botany*, 67: 257-263.
- Ammirato, P.V. 1974. Effects of ABA on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Bot. Gaz.*, 135 (4): 328-337.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. In: Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (eds). *Handbook of plant cell culture*, Vol. I, MacMillan, New York: 88-123.
- Ammirato, P.V. 1984. Induction, maintenance and manipulation of development in embryogenic cell suspension cultures. In: Vasil, I.K. (ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 1. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers: 139-151.
- Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. *Plant Tissue Culture. Plant Biology*, 3: 57-81.
- Ammirato, P.V. 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. *IAPTC Newsletter*, 57: 2-26.
- Bakry, F. and Rossignol, L. 1985. Analyse des capacités de callogénèse et d'organogénèse obtenues à partir de différents tissus de bananiers (*Musa* sp., Musacées). *Fruits* 40 (11): 697-708.



- Bakry, F., Lavarde-Guignard, F., Rossignol, L. et Demarly, Y. 1985. Développement de pousses végétatives à partir de la culture *in vitro* d'explants inflorentiels de bananiers (*Musa* sp. Musacées). *Fruits*, 40 (7-8): 459-465.
- Banerjee, N. and De Langhe, E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal conditions of *Musa* (banana and plantains). *Plant Cell Reports*, 4: 351-354.
- Banerjee, N., Vuylsteke, D. and De Langhe, E. 1986. Meristem tip culture of *Musa*: histomorphological studies of shoot bud proliferation. In: Withers, L.A. and Anderson, P.G. (eds). *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Butterworth Scientific Ltd, U.K.:139-147.
- Banerjee, N., Schoofs, J., Hollevoet, S., Dumortier, F. and De Langhe, E. 1987. Aspects and Prospects of somatic embryogenesis in *Musa* ABB, cv. Bluggoe. *Acta Horticulturae*, 212: 727-728.
- Barker, W.G. 1959. A system of maximum multiplication of banana plants. *Trop. Agric. (Trinidad)*, 36: 275-284.
- Berg, L.A. and Bustamante, M. 1974. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. *Phytopathol.*, 64: 320-322.
- Berlyn, G.P. and Miksche, J.P. 1976. *Botanical microtechniques and cytometry*. Iowa Univ. Press. Ames., Iowa, 326pp.
- Bouharmont, J. 1963. Evolution de l'ovule fécondé chez *Musa acuminata* Colla. ssp. *Burmanica* Simmonds. *La Cellule*, LXIII, Fasc. 2. Travaux de l'Institut Carnoy, Louvain, 84: 261-279.
- Butcher, D.N. and Ingram, D.S. 1976. *Plant tissue culture*. Edward Arnold, London. 68 pp.
- Champion, J. 1963. *Le bananier*. G.-P. Maisonneuve & Larose, Paris, 263pp.

- Cronauer, S.S. and Krikorian, A.D. 1983. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (*Musa* ABB). *Plant Cell Reports*, 2: 289-291.
- Cronauer, S.S. and Krikorian, A.D. 1986. Banana (*Musa* spp.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed). Vol. 1. Trees I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 233-252.
- Cronauer-Mitra, S.S. and Krikorian, A.D. 1987. Adventitious shoot production from calloid cultures of banana. *Plant Cell Reports*, 6: 443-445.
- Cronauer-Mitra, S.S. and Krikorian, A.D. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Reports*, 7: 23-25.
- De Langhe, E. 1961. Multiplication végétative accélérée, en plantation, du bananier plantain "Bosua". *Bull. d'Inform. de l'INEAC*: 70-87.
- De Langhe, E. 1987. Towards an international strategy for genetic improvement in the genus *Musa*. In: Persley, G.J. and De Langhe, E. (eds). *Banana and plantain breeding strategies*. ACIAR Proceedings, 21: 19-23.
- De Langhe, E., Swennen, R. et Wilson, G.F. 1983. Aspects hormonaux du rejetonnage des bananiers plantains. *Fruits*, 38 (4): 318-325.
- De Guzman, E.V., Decena, A.C. and Ubalde, E.M. 1980. Plantlet regeneration from unirradiated banana shoot-tip tissues *in vitro*. *Phillipp. Agric.*, 63: 140-146.
- De Touchet, B. Duval, Y. and Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports*, 10: 529-532.

- De Vries, S.C., Booij, H., Meyerink, P., Huisman, G., Wilde, H.D., Terry, L.T. and Van Kammen, A. 1988. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell suspension cultures. *Planta*, 176: 196-204.
- De Wald, C.S. 1989. Maturation and germination of Mango somatic embryos. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114(5): 837-841.
- Dhed'a, D. Dumortier, F. and De Langhe, E. 1989. Culture en suspensions cellulaires et régénération en plantules chez *Musa* ABB, cv. Matavia. CIRAD R.A. 89, Doc. n°71.
- Dhed'a, D. and Panis, B. 1991. Cell suspension culture and somatic embryogenesis in *Musa*. *Banana Newsletter* N° 14: 12-14.
- Dhed'a, D., Dumortier, F., Panis, B., Vuylsteke, D. and De Langhe, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana, cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). *Fruits*, 46 (2): 125-135.
- Do, C.B. and Cormier, F. 1991. Effects of high ammonium concentration on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. *Plant cell, Tissue and Organ culture.*, 27: 169-174.
- Dodds, J.H. and Roberts, L.W. 1982. *Experiments in plant tissue culture*. Cambrigde Univ. Press, London, New York. 178pp.
- Edwin, F.C. and Sherington, P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Ltd Edington. 709pp.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2nd ed. John Wiley & Sons, N.Y. 550pp.

- Escalant, J.V. 1990. Using tissue culture techniques for production of new varieties of plantain and early screening against Black Sigatoka. In: Fullerton, R.A. and Stover, R.R. (eds). Sigatoka Leaf Spot Diseases of bananas. Proceedings of an international workshop held at San José, Costa-Rica, INIBAP, March 28-April 1, 1989: 338-348.
- Escalant, J.V. et Teisson, C. 1988. Embryogénèse somatique chez *Musa* sp. C.R. Acad. Sci. Paris, t. 306, Série III: 277-281.
- Escalant, J.V. and Teisson, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Reports, 7: 665-668.
- Evans, D.A., Sharp, W.R. and Flick, C.E. 1981. Growth and behavior of cell cultures. Embryogenesis and organogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and application in Agriculture. Proceedings of UNESCO Symposium, Sao Paulo, Brazil, 1978, Academic Press, New York: 45-113.
- Evans, D.A., Sharp, W.R. and Medina-Filho, H.P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Am. J. Bot., 71: 759-774.
- Everett, N.P., Robinson, K.E.P. and Mascarenhas, D. 1987. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Bio/Technol., 5: 1201-1204.
- FAO, 1989. Production. FAO Yearbook, Vol. 43. Rome: 346pp.
- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. Histochemie, 16: 92-96.
- Frison, E.A. and Putter, C.A.J. (eds). FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of *Musa* germplasm., Rome, 23pp.
- Gatin, C.L. 1908. Recherches anatomiques sur l'embryon et la germination des Cannacées et des Musacées. Sci. Nat. Bot. (Paris), 9 (8): 113-146.

- Haccius, B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*, 28: 74-81.
- Haccius, B. and Philip, V.J. 1979. Embryo development in *Cocos nucifera* L.: a critical contribution to a general understanding of palm embryogenesis. *Plant Systematic Evolution*, 132: 91-106.
- Halperin, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Am. J. Bot.* 53: 443-453.
- Halperin, W. and Jensen, W.A. 1967. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J. Ultrastructure Research*, 18: 428-443.
- Hamilton, K.S. 1965. Reproduction of banana from adventitious buds. *Trop. Agric. Trin.*, 42: 69-73.
- Harran, S. 1991. Etude de cals inflorentiels de deux cultivars de bananiers (901 et GN) et des plantes qui en sont issues. Thèse de doctorat, Université de Paris-Centre d'Orsay. 119pp.
- Henshaw, G.G., Jha, K.K., Mehta, A.K., Shakeshaft, D.J. and Street, H.E. 1966. Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *J. Exper. Bot.*, 17 (51): 362-377.
- Henshaw, G.G., O'Hara, J.E. and Westcott, R.J. 1980. Tissue culture methods for storage and utilization of potato germplasm. In: Ingram, D.S. and Helgson, J.P. (eds). *Tissue culture methods for plant pathologists*. Blackwell, Oxford: 71-76.
- Hwang, S.C. and Ko, W.H. 1987. Somaclonal variation of bananas and screening for resistance to *Fusarium* wilt. In: Persley, G.J. and De Langhe, E. (eds). *Banana and plantain breeding strategies*. ACIAR Proceedings N°21: 151-156.

- INIBAP, sd. Looking ahead a strategy of choice. Montpellier, France. 71pp.
- INIBAP, 1988. Annual Report. Montpellier, France. 30pp.
- INIBAP, 1990. Annual Report. Montpellier, France. 48pp.
- Jarret, R.L., Fisher, J.B. and Litz, R.E. 1985. Organ formation in *Musa* tissue culture. *J. Plant Physiol.*, 121: 123-130.
- Johri, B.M. and Rao, P.S. 1984. Experimental embryology. In: Johri, B.M. Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 735-789.
- Kito, S.L. and Janick, J. 1985. Production of artificial seeds by encapsulating asexual somatic embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110 (2): 277-282.
- Krikorian, A.D. 1987. Callus and cell culture, somatic embryogenesis and related techniques for *Musa* improvement. In: Persley, G.J. and De Langhe, E. (eds). Banana and plantain breeding strategies. ACIAR Proceedings, 21: 128-135.
- Krikorian, A.D. and Kann, R.P. 1981. Plantlet production from morphogenetically competent cell suspensions of Daylily. *Am. J. Bot.*, 47: 679-686.
- Krikorian, A.D. and Cronauer, S.S. 1984. Aseptic culture techniques for banana and plantain improvement. *Economic Botany*, 38: 322-331.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation -a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genetics*, 60: 197-214.
- Lo Wai-jane and Vasil, I.K. 1983. Somatic embryogenesis in Sugar cane (*Saccharum officinalis* L.). I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, 118: 169-180.

- Lu, Chin-Yi and Vasil, I.K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely-suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* Jacq. Ann.Bot., 48: 543-548.
- Lu, Chin-Yi and Vasil, I.K. 1985. Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea grass). Amer. J. Bot. 72(12): 1908-1913.
- Ma, S.S., Shii, C.T. and Wang, S.O. 1978. Regeneration of banana plants from shoot meristem tips and inflorescence sections *in vitro*. Abstr. 20th Int. Hortic. Congr. 1639 Sydney.
- Maroquin, C.G., Padoscheck, C., Escalant, J.V. and Teisson, C. (soumis) Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata* ssp burmannicoides and *Musa acuminata malaccensis*. *In vitro* Plant Cell and Developmental biology.
- Marousky, F.J. and Shirlye, H.W. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured mature caryopses of bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge). Plant cell, Tissue and Organ culture, 20: 125-129.
- McGahan, M.W. 1961a. Studies on the seed of banana. I. Anatomy of the seed and embryo of *Musa balbisiana*. Am. J. Bot., 48: 230-238.
- McGahan, M.W. 1961b. Studies on the seed of banana. II. The anatomy and physiology of the seedling of *Musa balbisiana*. Am. J; Bot., 48: 630-638.
- McGranaham, G.H., Leslie, C.A., Uratsu, S.L., Martin, L.A. and Dandekar, A.M. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. Bio/Technol., 6: 800-804.
- McManus, J.F.A. 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid treatment. Nature, 158: 202.

- McWilliam, A.A., Smith, S.M. and Street, H.E. 1974. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). *Ann. Bot.*, 38: 243-250.
- Mohan Ram, H.Y. and Steward, F.C. 1964. The induction of growth in explanted tissue of banana fruit. *Can. J. Bot.*, 42: 1559-1579.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco callus tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Murfett, J. and Clarke, A. 1987. Producing Disease-Resistant *Musa* cultivars by Genetic Engineering. In: Persley, G.J. and De Langhe, E. (eds). *Banana and plantain breeding strategies*. ACIAR Proceedings N°21, 87-94.
- Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Applied and Fundamental Aspects of Plant cell, tissue, and organ culture*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York: 179-248.
- Natesh, S. and Rau, M.A. 1984. The embryo. In: Johri, B.M. (ed.). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 377-444.
- Nomura, N. and Komatine, A. 1985. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in carrot suspension cultures. *Plant Physiol.*, 79: 988-991.
- Nomura, N. and Komatine, A. 1986a. Molecular mechanism of somatic embryogenesis. *Oxford Sur. Plant Molec. and Cell Biol.* 3: 456-466.
- Nomura, N. and Komatine, A. 1986b. Embryogenesis from microinjected single cells in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci.* 44: 53-58.



- Nørgaard, J.V. and Krogstrup, P. 1991. Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* LK. *Plant Cell Repots*, 9: 509-513.
- Noriega, C. and Söndahl, M.R. 1991. Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. *Bio/Technol.*, 9:191-193.
- Novak, F.J., Afza, R., Van Duren, M., Perea-Dallos, M., Conger, B.V. and Xiaolang, T. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technol.* 7, 147-158.
- Palmer, J.K. 1963. Banana polyphenoloxidase preparation and properties. *Plant Physiol.*, 38: 508-513.
- Panis, B.J. 1991. The conservation of banana germplasm through cryopreservation. *Banana Newsletter* N°14: 38-39.
- Panis, B.J., Withers, L.A. and De Langhe, E. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *Cryo-letters* 11, 337-350.
- Panis, B., Dhed'a, D. and Swennen, R. 1992. Freeze-preservation of embryogenic *Musa* suspension cultures. In: Adams, R.P. and Adams, J.E. (eds). *Conservation of Plant genes. DNA banking and in vitro biotechnology*. Academic Press, Inc.: 183-195.
- Persley, G.J. and De Langhe, E., 1987. Banana and plantain breeding strategies. *ACIAR Proceedings* N°21. 187pp.
- Rashid, A. 1988. *Cell Physiology and Genetics of higher plants*. Vol. I. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 169pp.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P. and Kossler, M. 1988. Artificial seeds: Encapsulation of somatic embryos. In: Valentine, A. *Forest and crop biotechnology. Progress and prospects*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 400-419.

- Reinert, H.J. and Yeoman, 1982. Plant cell and tissue culture. A laboratory manual. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 83pp.
- Remy, S. 1992. Transiënte genexpressie door electroporatie in bananeprotoplasten (*Musa* spp. ABB groep cv. 'Bluggoe'). Thèse d'ingénieur agronome, K.U.Leuven. 98pp.
- Rowe, P. 1984. Breeding bananas and plantains. In: Janick, J. (ed.). Plant breeding review 2, Westport, Connecticut, AVI Publishing Co: 135-155.
- Sannasgala, K., Dumortier, F. and De Langhe, E., 1987a. Mass production of "proembryo-like" structures in *Musa* ABB, cv. Bluggoe. Florizel 87, 247-250.
- Sannasgala, K., Dumortier, F. and De Langhe, E., 1987b. Plants from "proembryo-like" structures in *Musa* ABB, cv. Bluggoe. Florizel 87, 251-254.
- Sannasgala, K., 1989. In vitro somatic embryogenesis in *Musa*. Dissertationes de Agricultura N° 180. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium, 172 pp.
- Schripsema, J., Meijer, A.H., Van Iren, F., Ten Hoopen, H.J.G. and Verpoorte, R. 1990. Dissimilation curve as a simple method for characterization of growth of plant cell suspension cultures. Plant Tissue and Organ Culture, 22: 55-64.
- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50: 199-204.
- Schwendiman, J., Pannetier, C. and Michaux-Ferrière, N. 1988. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. Annals of Botany, 62: 43-52.

- Scowcroft, W.R. 1984. Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. IBPGR Report 84/152, Rome, 41pp.
- Sharp, W.R., Caldes, L.S. and Maraffa, S.B. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. In: Janick, J. (ed.). Hort. Review, Wesport, Connecticut, 64: 268-310.
- Sharp, W.R., Evans, D.A. and Sondahl, M.R. 1982. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture. Proceedings 5th International congress of plant tissue culture, Japan: 759-762.
- Shepherd, K. 1987. Banana breeding -past and present. Acta Horticulturae, 196: 37-43.
- Shoemaker, R.C., Amberger, L.A., Palmer, R.G., Oglesby, L. and Ranch, J.P. 1991. Effect of 2,4-D concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). In Vitro Cell. Dev. Biol. (sous Presse).
- Simmonds, N.W. 1966. Bananas. 2nd ed. Longman, London, New York, 512pp.
- Simmonds, N.W. and Shepherd, K. 1955. The taxonomy and origin of cultivated bananas. J. Linn. Soc. (Bot.), 55: 302-312.
- Smith, L.D. and Krikorian, A.D. 1988. Production of somatic embryos from carrot tissues in hormone-free medium. Plant Science, 58: 103-110.
- Smith, L.D. and Krikorian, A.D. 1990. pH control of carrot somatic embryogenesis. Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, June 24-29: 242.

- Speleman, T. 1992. Optimalisatie van de methode voor het initiëren van embryogene cellen bij drie bananevariëteiten (*Musa* spp.). Thèse d'ingénieur agronome, K.U.Leuven, 101pp.
- Srinivasa Rao, N.K., Chacko, E.K., Dore Swamy, R. and Narayanaswamy, N. 1982. Induction of growth in explanted inflorescence axis of banana. *Current Science*, 51: 666-667.
- Steward, F.C., Mapes, M.O. and Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45: 705-708.
- Stover, R.H. and Simmonds, N.W. 1987. Bananas. Tropical Agriculture Series. 3rd ed. Longman Scientific and Technical Publishers.
- Swennen, R. 1990. Plantain cultivation under west african conditions. A production manual. I.I.T.A, Ibadan, Nigeria. 24pp.
- Swennen, R. and Wilson, G.F. 1982. The stimulation of sword suckers in plantain (*Musa* sp. AAB) by applied gibberellin. *Paradisiaca*, 5: 7.
- Swennen, R. et Wilson, G.F. 1983. La stimulation du développement du rejet baionette du bananier plantain (*Musa* sp. groupe AAB) par application de gibbérelline ( $GA_3$ ). *Fruits*, 38 (4): 261-265.
- Swennen, R., Wilson, G.F. and De Langhe, E. 1984. Preliminary investigation of the effects of gibberellic acid ( $GA_3$ ) on sucker development in plantain (*Musa* cv. AAB) under field conditions. *Tropical Agric. (Trinidad)*, 61 (4): 253-256.
- Swennen, R. 1984. A physiological study of the suckering behaviour in plantain (*Musa* cv. AAB). Ph.D. Thesis, Fakulteit der landbouwwetenschappen, K.U.Leuven, 180pp.

- Swennen, R. and Vuylsteke, D. 1991. Bananas in Africa: Diversity, uses and prospects for improvement. In: Ng, N.Q., Perrinno, P., Attere, F. and Zedan, H. Crop genetics resources of Africa. Proceedings of an International Conference on Crop genetic resources of Africa. 17-20 Oct. 1988, Ibadan, Nigeria, Vol. II: 151-159.
- Swennen, R. and Vuylsteke, D. (accepted). Breeding black Sigatoka resistant plantains with a wild banana. Tropical Agriculture.
- Swennen, R. Vuylsteke, D. and De Smet, K. 1991. Season-dependent seed set in plantain. Banana Newsletter, 14: 35-36.
- Taya, M., Hegglin, M., Prenosil, J.E. and Bourne, J.R. 1989. On-line monitoring of cell growth in plant tissue cultures by conductometry. Enzym. Microb. Technol., 11: 170-176.
- Tezenas du Montcel, H., Swennen, R. and De Langhe, E. 1983. Essai de classification des bananiers plantains (AAB). Fruits, 38 (6):318-325.
- Tisserat, B., Esau, K. and Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. In: Janick, J. (ed.) Hort. Reviews, Westport, Connecticut, AVI Publishing Co: 1-78.
- Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H. and Hinata, K. 1988. Transgenic rice plant after direct gene transfer into protoplasts. Bio/Technol., 6: 1072-1074.
- Valmayor, R.V., Rivera, F.N. and Lomuljo, F.M. 1981. Philippine cultivar names and synonyms. Inst. Plant Breeding, Bulletin N° 3, Univ. Philippines, Los Banos, 16pp.
- Van Wauwe, A., 1992. Isolatie van protoplasten uit een embryogene celsuspensie van banaan (*Musa* spp., ABB). Thèse d'ingénieur agronome, K.U.Leuven. 87pp.

- Vasil, V. and Vasil, I.K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of Pearl Millet (*Pennisetum americanum*). Ann. Bot., 47, 669-678.
- Vasil, V. and Vasil, I.K. 1982. Characterization of embryogenic cell suspension derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl Millet, Gramineae). Amer. J. Bot., 69 (9): 1441-1449.
- Vasil, V. and Vasil, I.K. 1988. Regeneration in cereal and other grass species. In: Vasil, I.K. (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. Acad. Press, Inc.: 121-150.
- Vloeberghs, L. 1992. Karakterisatie van de cel-suspensiegroei vóór en na cryopreservatie bij banaan (*Musa* spp.). Thèse d'ingénieur agronome, K.U.Leuven. 92pp.
- Vuylsteke, D. and De Langhe, E. 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. Trop. Agr. (Trinidad), 62: 323-328.
- Vuylsteke, D. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. IBPGR. Rome, 56pp.
- Vuylsteke, D. Swennen, R. Wilson, G.F. and De Langhe, E. 1988. Phenotypic variation among *in vitro* propagated plantain (*Musa* sp., cv. AAB). Scientia Horticultura, 36 (1-2): 79-88.
- Vuylsteke, D. Swennen, R. and De Langhe, E. 1991. Somaclonal variation in plantains (*Musa* spp., AAB group) derived from shoot-tip culture. Fruits, 46 (4): 429-439.
- White, P.R. 1928. Studies on the banana. An investigation of the floral morphology and cytology of certain types of the genus *Musa* L. Zeitschr. Zelforsch., Mikrosk. Anat. 7: 673-733.

- Widholm, J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol*, 47: 189-194.
- Williams, E.G. and Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as embryogenic groups. *Ann. Bot.*, 57: 443-462.
- Wilson, G.F., Vuylsteke, D. and Swennen, R. 1985. Rapid multiplication of plantain: an improved field technique. Proceedings of the third meeting, 27-31 May 1985, International Association for Research on plantain and bananas, Abidjan, Côte d'Ivoire: 24-26.
- Zrýd, J.P. 1988. Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Presses Polytechniques Romandes, 308pp.

**ANNEXES**



Annexe 1: Analyse de variance (GLM) et test de Duncan pour l'effet des régulateurs de croissance sur le nombre de globules méristématiques (Fig. 11, 12, 13)

Dependent Variable: NRG

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	45567.93627	3505.22587	11.08	0.0001
Error	37	11706.41667	316.38964		
Corrected Total	50	57274.35294			
	R-Square	C.V.	Root MSE		NRG Mean
	0.795608	107.2287	17.78734		16.5882353

Dependent Variable: NRG

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REG	13	45567.93627	3505.22587	11.08	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REG	13	45567.93627	3505.22587	11.08	0.0001

General Linear Models Procedure

Duncan Grouping	Mean	N	REG
A	100.75	4	M
B	73.00	3	N
C	24.50	2	F
C	17.25	4	G
C	9.00	4	B
C	6.33	3	C
C	5.75	4	E
C	2.00	3	D
C	2.00	4	K
C	1.50	4	L
C	1.00	4	H
C	1.00	4	A
C	0.00	4	J
C	0.00	4	I

NRG: Nombre de globules méristématiques

REG: Régulateurs de croissance

N.B.: Les moyennes précédées des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

Annexe 2: Analyse de variance (GLM) et test de Duncan pour l'effet des régulateurs de croissance sur le nombre de cellules libres (Fig. 11, 12, 13)

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: NRC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	44415.44794	3416.57292	18.11	0.0001
Error	37	6979.42500	188.63311		
Corrected Total	50	51394.87294			
	R-Square	C.V.	Root MSE		NRC Mean
	0.864200	62.17960	13.73438		22.0882353

Dependent Variable: NRC

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REG	13	44415.44794	3416.57292	18.11	0.0001
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REG	13	44415.44794	3416.57292	18.11	0.0001

Duncan Grouping			Mean	N	REG
	A		102.20	4	M
	B		80.00	3	N
	C		29.60	2	F
D	C		27.33	4	G
D	C	E	21.30	3	C
D	C	E	12.90	4	L
D	C	E	11.05	4	E
D	C	E	10.63	4	B
D	C	E	9.18	4	K
D		E	5.20	3	D
D		E	4.18	4	A
D		E	3.95	4	H
D		E	3.17	4	J
		E	2.37	4	I

NRC: Nombre de cellules libres

REG: Régulateurs de croissance

N.B.: Les moyennes précédées des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

Annexe 3 Analyse de variance (GLM) et test de Duncan pour l'effet l'âge de la subculture de prolifération sur le nombre de globules méristématiques (Fig. 17)

Dependent Variable: GLOB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	21808.75181	2726.09398	8.38	0.0001
Error	83	27001.71558	325.32187		
Corrected Total	91	48810.46739			

R-Square	C.V.	Root MSE	GLOB Mean
0.446805	74.91534	18.03668	24.0760870

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AGE	5	6027.67572	1205.53514	3.71	0.0045
WEEKS	3	15781.07609	5260.35870	16.17	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AGE	5	6027.67572	1205.53514	3.71	0.0045
WEEKS	3	15781.07609	5260.35870	16.17	0.0001

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AGE
A	40.917	12	2
B	27.750	16	4
B	25.250	16	1
B	23.687	16	3
B	16.750	16	5
B	14.313	16	6

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	WEEKS
A	39.826	23	8
A	32.609	23	7
B	17.870	23	6
C	6.000	23	5

GLOB: globule méristématique

N.B.: Les moyennes précédées des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

Annexe 4 Analyse de variance (GLM) et test de Duncan pour l'effet l'âge de la subculture de prolifération sur le nombre de cellules libres (Fig. 17)

Dependent Variable: CELL

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	21305.49466	2663.18683	18.40	0.0001
Error	83	12010.07001	144.69964		
Corrected Total	91	33315.56467			

R-Square	C.V.	Root MSE	CELL Mean
0.639506	54.16664	12.02912	22.2076087

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AGE	5	3840.94738	768.18948	5.31	0.0003
WEEKS	3	17464.54728	5821.51576	40.23	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AGE	5	3840.94738	768.18948	5.31	0.0003
WEEKS	3	17464.54728	5821.51576	40.23	0.0001

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	AGE
A	36.133	12	2
B	25.019	16	4
C	22.888	16	1
C	19.481	16	6
C	19.431	16	3
C	13.775	16	5

Alpha= 0.05 df= 83 MSE= 144.6996

Number of Means	2	3	4
Critical Range	7.063	7.427	7.663

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	WEEKS
A	42.543	23	8
B	26.665	23	7
C	12.857	23	6
C	6.765	23	5

CELL: Cellules libres

N.B.: Les moyennes précédées des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

Annexe 5 Analyse de variance et test de Duncan pour l'évolution du nombre total de cellules libres au cours de la maintenance en fonction des dilutions (Fig. 26)

Dependent Variable: NTOTC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2238.791667	447.758333	7.95	0.0001
Error	66	3718.083333	56.334596		
Corrected Total	71	5956.875000			

R-Square	C.V.	Root MSE	NTOTC Mean
0.375833	36.39097	7.505638	20.6250000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
EXP	2	2007.000000	1003.500000	17.81	0.0001
TREAT	1	0.347222	0.347222	0.01	0.9377
EXP*TREAT	2	231.444444	115.722222	2.05	0.1363

Alpha= 0.05 df= 66 MSE= 56.3346

Number of Means 2 3  
Critical Range 4.329 4.552

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	EXP
A	26.375	24	3
B	21.875	24	2
C	13.625	24	1

N.B.: NTOTC = Nombre total de cellules  
1= dilution 1:1  
2= dilution 1:2  
3= dilution 1:3





ABIB



0 0 6 5 7 5 6 4 4

atte/1743