

# Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et régénération en plantules par embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain *Musa* spp.\*

D. Dhed'a

Keywords: Embryogenic cell suspension culture - Regeneration - Somatic embryogenesis - Bananas - Plantains *Musa* spp.

## Résumé

Des suspensions cellulaires embryogéniques ont été initiées en utilisant des explants de bourgeons méristématiques en prolifération (scalps). Le milieu de culture pour l'initiation a été le milieu de Murashige et Skoog modifié enrichi, suivant les étapes de culture, en  $5 \mu\text{M}$  2,4-D,  $1-10 \mu\text{M}$  BAP ou zéatine. Les suspensions obtenues chez 5 variétés de bananier ont été capables de régénérer des plantes entières par voie d'embryogénèse somatique. Les suspensions embryogéniques se sont révélées être un matériel de choix pour la cryoconservation, l'isolement et la culture des protoplastes et pour la manipulation génétique du bananier en vue de la résistance aux maladies.

## Summary

Embryogenic cell suspensions have been initiated using explants from meristematic shoot-tips (scalps). The culture medium has been a modified Murashige and Skoog medium supplemented, according to the steps of culture, with  $5 \mu\text{M}$  2,4-D,  $1-10 \mu\text{M}$  BAP or zeatin. The suspensions obtained for 5 banana varieties have regenerated plants through somatic embryogenesis. Embryogenic cell suspensions have proved to be the material of choice for cryopreservation, protoplast isolation and culture and for genetic manipulation of *Musa* for resistance to diseases.

## Introduction

Le bananier et le bananier plantain sont des cultures alimentaires d'une grande importance dans les pays tropicaux. Le bananier cultivé étant triploïde et ne produisant pas de graines, sa multiplication se fait par voie végétative. Ce mode de multiplication demeure limité, malgré des nombreuses recherches effectuées pour augmenter le taux de rejetonage (2). Pour résoudre ce problème, la multiplication *in vitro* à partir de méristème a été envisagée, étudiée et éprouvée (1). En effet, non seulement le taux de multiplication *in vitro* est de loin supérieur à celui qu'on peut obtenir au champ, mais encore, les plantules issues d'*in vitro* sont saines, exemptes de charançons, de nématodes et de champignons. C'est pourquoi, les techniques de cultures *in vitro* sont recommandées pour les échanges de germoplasmes du bananier (5). Le mode de multiplication végétative rend aussi difficile l'amélioration génétique du bananier par les méthodes classiques basées sur la fécondation croisée (3). Néanmoins, certains programmes basés sur ces méthodes ont permis l'obtention des nouveaux cultivars (10).

Le développement des maladies virulentes et la nécessité de l'amélioration génétique du bananier ont fait que les efforts soient de plus en plus orientés vers les voies alternatives utilisant les techniques biotechnologiques. Dans celles-ci, la culture des cellules, de protoplastes et la régénération à partir de ceux-ci des plantes entières constituent une étape très importante. De nombreux travaux ont ainsi été entrepris dans le but d'initier des suspensions cellulaires chez le bananier (7).

Le présent article constitue un résumé des travaux que nous avons effectués pour la mise au point des cultures de sus-

pensions cellulaires embryogéniques chez le bananier (4). L'intérêt d'un tel travail réside dans le fait que, les suspensions cellulaires embryogéniques constituent un matériel de choix pour la multiplication rapide, la cryoconservation (congélation à  $-196^\circ\text{C}$  dans l'azote liquide) du germoplasme (8) et pour la manipulation génétique du bananier en vue de la résistance aux maladies (9).

## Matériel et méthodes

Le matériel végétal a été constitué de différentes variétés de bananier. La procédure générale établie pour la culture de suspensions cellulaires embryogéniques est présentée par la figure 1, les milieux de culture et la durée nécessaire pour chaque étape de culture sont présentés par le tableau 1.

Le matériel de départ pour l'initiation des suspensions cellulaires ont été les explants prélevés sur les bourgeons méristématiques en prolifération ou scalps. Le milieu de base a été le milieu de Murashige et Skoog ou MS (6) enrichi suivant les étapes de culture en AIA (acide  $\beta$  indole acétique) ou 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) comme auxine et en BAP (6-benzylaminopurine) ou zéatine comme cytokinine à des concentrations de 1 à  $100 \mu\text{M}$ .

Des études morphologiques et histologiques ont été effectuées afin de montrer l'origine des cellules embryogéniques et de décrire le processus de l'embryogénèse somatique en culture de suspensions cellulaires chez le bananier et de comparer ce processus avec celui de l'embryogénèse zygotique chez les bananiers diploïdes sauvages.

\* Thèse de doctorat présentée le 4 décembre 1992 à la K.U. Leuven. Promoteurs: Prof. Dr. R. Swennen, Laboratorium Tropische Plantenteelt, Faculteit der Landbouwwetenschappen, et Prof. Dr. J. Vendlig, Laboratorium plantenfysiologie, Faculteit der Wetenschappen, K.U. Leuven, Kardinaal Mercierlaan 92 B-3001 Heverlee, Belgique.

Reçu le 27 01 93 et accepté pour publication le 27 01 93

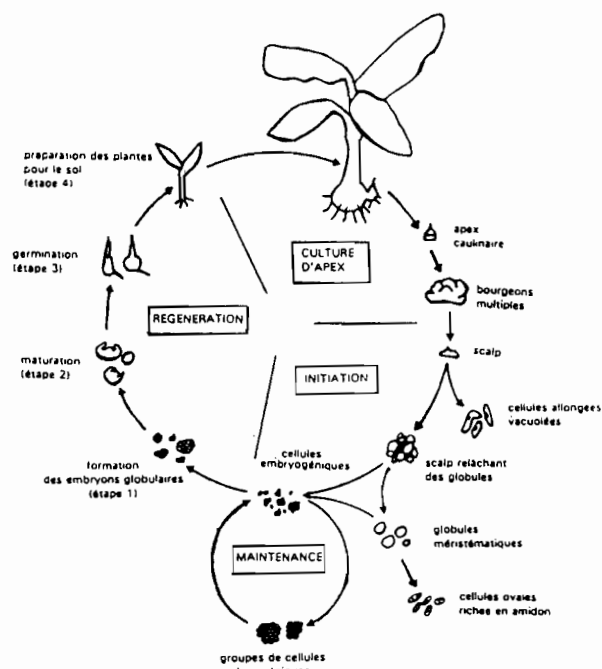


Figure 1 — Représentation schématique de la culture de suspensions cellulaires embryogéniques et de régénération de plantes à partir d'elles chez *Musa* ABB, cv. Bluggoe (4).

TABLEAU 1

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 (4).

Étapes	Milieux	Durée
Culture d'apex	MS (semi-solide) + 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

## Résultats et discussion

En utilisant les scalps comme matériel de départ, des suspensions cellulaires embryogéniques ont été obtenues chez 5 variétés: une variété sauvage, *Musa balbisiana* (génotype BB), 3 cultivars de bananier à bananes à cuire, Bluggoe, Saba et Cardaba (génotype ABB) et un cultivar de plantain, Three Hand Planty (génotype AAB). Ces suspensions ont pu régénérer des plantes avec une fréquence variant entre 23,1-54,4%. La régénération a suivi la voie de l'embryogénèse somatique, laquelle a montré des similitudes remarquables avec l'embryogénèse zygotique chez des bananiers diploïdes sauvages. Seulement 0,7% de variation somaclonale a été observée en plein champ à l'International Institute of Tropical Agriculture IITA (Nigeria) chez les plantes issues d'embryons somatiques.

## Conclusion

L'ensemble de résultats obtenus montre que des suspensions cellulaires embryogéniques peuvent être initiées en utilisant les scalps comme explants. L'obtention des suspensions embryogéniques chez 5 variétés représentant 2 niveaux de ploïdies et 3 combinaisons de génomes montre qu'il est possible d'initier des suspensions cellulaires embryogéniques chez un grand nombre de variétés dont les caractéristiques en culture *in vitro* correspondent à l'une ou l'autre variété.

Les recherches en cours montrent que ces suspensions cellulaires constituent un matériel de choix pour la culture des protoplastes et la manipulation génétique du bananier en vue de la résistance aux maladies.

**Samenvatting:** Embryogene celsuspensies werden geïnitieerd, gebruik makend van prolifererende meristemen (scalps) als uitgangsmateriaal. Het basismedium, dit van Murashige en Skoog, werd naargelang de stappen in het initiatieproces verder aangerijkt met 5  $\mu$ M 2,4-D, 1-10  $\mu$ M BAP of zeatine. Voor 5 verschillende bananecultivars werden suspensies bekomen en konden planten geregenereerd worden via somatische embryogenese. De embryogene celsuspensies blijken verder een uitstekend uitgangsmateriaal te zijn voor volgende toepassingen: cryopreservatie, isolatie en cultivatie van protoplasten en genetische manipulatie, met het oog op resistentie tegen bananeplagen.

## Références bibliographiques

- Banerjee, N. & 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.
- De Langhe, E., 1961. Multiplication végétative accélérée, en plantation, du bananier plantain «Bosua». *Bull. d'inform. de l'INEAC*: 10-87.
- 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.
- Dhed'a, D., Dumortier, F., Panis, B., Vuylsteke, D. & 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.
- Frison, E.A. & Putter, C.A.J. (eds.), 1989. *FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of Musa germplasm*. Rome, 23 pp.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco callus tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.

7. Novak, F.J., Afza, R., Van Duren, M., Perea-Dallos, M., Conger, B.V. & 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.
8. Panis, B.J., Withers, L.A. & De Langhe, E., 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *Cryo-letters* **11**, 337-350.
9. Panis, B., Dhed'a D. & Swennen, R., 1993 (sous presse). Cell suspensions from somatic tissue in *Musa*: Applications and prospects. Proceedings of the International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests, CIRAD, Montpellier France, Sept. 7-9, 1992.
10. Swennen, R. & Vuylsteke D., 1993. Breeding black Sigatoka resistant plantains with a wild banana. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, Vol. **70** (1): 74-77.

D. Dhed'a Zairois Docteur en Sciences. K.U.Leuven, Chef de Travaux Faculté des Sciences, Université de Kisangani.

#### 46e Internationaal Symposium over Fytopharmacie en Fytiatrie.

plaats zal vinden op dinsdag 3 mei 1994 in de lokalen van de Faculteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent (België).

Volgende onderwerpen zullen aan bod komen:

- Insecticiden, Entomologie, Nematologie, Toegepaste Bodemzoölogie.
- Fungiciden, Fytopathologie, Fytovirologie, Fytopharmacie.
- Herbiciden, Herbologie, Plantengroei-regulators
- Biologische en Geïntegreerde Bestrijding
- Residu's, Toxicologie, Formulerings, Toepassingstechnieken

De samenvattingen van de mededelingen zullen aan de deelnemers beschikbaar gesteld worden in het Engels.

De voorgestelde mededelingen zullen gepubliceerd worden in de «Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent».

Alle briefwisseling dient gericht te worden aan:

#### The 46th International Symposium on Crop Protection

will take place on May 3th 1994 at the Department of Crop Protection of the Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, University of Ghent (Belgium).

The following topics will be treated:

- Insecticides, Entomology, Nematology, Applied Soil Zoology
- Fungicides, Phytopathology, Phytovirology, Phytobacteriology.
- Herbicides, Herbology, Plant Growth Regulators
- Biological and Integrated Control of Pests and Diseases
- Residues, Toxicology, Ecotoxicology, Formulations, Application Techniques

The summaries of the papers will be made available to the participants in English.

The proceedings will be published in the «Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent».

All correspondance is to be sent to:

#### Le 46e Symposium International de Phytopharmacie et de Phytiatrie

se tiendra le mardi 3 mai 1994 dans les locaux de la Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées, Université de Gand (Belgique).

Les sujets suivants sont traités:

- Insecticides, Entomologie, Nématologie, Pédologie.
- Fongicides, Phytopathologie, Phytovirologie.
- Herbicides, Herbologie, Régulateurs de croissance
- Lutte Biologique et Intégrée
- Résidus, Toxicologie, Formulations, Techniques d'application.

Le recueil des résumés des communications sera mis à la disposition des participants en anglais.

Les comptes-rendus seront publiés dans les «Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent».

Toute correspondance est à adresser à:

Dr. ir. L. Tirry, Faculteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Coupure Links 653, B-9000 Gent (België) - (Tel. 32(0) 9 264 61 52, Telefax 32(0) 9 264 62 39 of 264 62 49).