



Micropropagation *in vitro* de la variété locale « Aloga » du bananier plantain (*Musa x paradisiaca* L.) au Bénin

Christophe Bernard GANDONOU^{1,2,3*}, Corneille AHANHANZO^{1,2},
Clément AGBANGLA¹, Arnaud AGBIDINOUCOUN¹, Arsène DOUSSOH¹,
Gilles CACAÏ¹ et René DOSSOUKPEVI^{1,2}

¹Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC),
OIBP 526 Cotonou, République du Bénin.

²Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST) ; Immeuble Adjahoungbêta, Etoile
Rouge, Rue CEP-IB-Formation, 03 BP1665 Cotonou, République du Bénin.

³Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC),
OIBP 526 Cotonou, République du Bénin.

*Corresponding author, E-mail: ganchrist@hotmail.com ; Tel. (00229) 97 39 69 78

RESUME

Le bananier plantain (*Musa x paradisiaca* L.) est une banane consommée sous forme cuite qui contribue à la sécurité alimentaire et aux revenus des populations de l'Afrique sub-saharienne. Le développement de la culture de cette plante est limité par de nombreuses maladies dont la dissémination est facilitée par la multiplication végétative par rejets qui est le principal mode de reproduction de cette plante. Dans ce travail, la multiplication *in vitro* de la variété locale Aloga de bananier plantain (*Musa x paradisiaca* L.) a été étudiée. Le milieu de culture de base utilisé a été additionné de différentes concentrations de l'acide naphthylacétique (ANA), de l'acide indole-3-acétique (AIA) et de benzylaminopurine (BAP). Le milieu d'induction et de multiplication contient l'AIA (10^{-6} N) et la BAP (0.02 N), tandis que le milieu d'enracinement est composé de BAP (0.001 N) et de l'ANA (10^{-6} N). Les explants sont constitués des bourgeons apicaux prélevés à partir de rejets fraîchement récoltés. Nous avons réussi à multiplier *in vitro* la variété Aloga avec un taux de multiplication de 3 à 8 rejets par explant et par mois. Par ailleurs, les vitroplants obtenus se sont bien enracinés et ont bien répondu à l'acclimatation. Leur transfert en plein champ a permis d'avoir des plantes avec une taille moyenne d'environ 20 cm, un diamètre à la base de la tige avoisinant 10 cm et un nombre de feuilles vertes de l'ordre de 6 après 3 à 4 mois de culture en plein champ. Cette étude ouvre la voie au développement de la micropropagation du plantain au Bénin dans le but de fournir aux producteurs du matériel de plantation indemne de parasites et en grande quantité.

© 2012 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Banane plantain, variété locale, Aloga, culture *in vitro*, micropropagation, acclimatation.

INTRODUCTION

Le bananier (*Musa* spp.) est une plante fruitière de grande importance alimentaire, économique et socioculturelle, du genre *Musa*

appartenant à la famille des Musacées, très cultivé dans les régions tropicales du monde. La banane occupe la quatrième place dans l'alimentation humaine après le riz, le blé et le

© 2012 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v6i3.16>

maïs (Lassoudière, 2007). Avec une production de plus de 106 millions de tonnes produites annuellement à l'échelle mondiale, la banane occupe le premier rang de la production fruitière (Lescot, 2006). Au Bénin, sa production est estimée à 29000 tonnes en 2005 (Lescot, 2006). Les variétés comestibles résulteraient d'hybridations interspécifiques très anciennes des diploïdes fertiles de deux grandes espèces : *Musa acuminata* (AA) et *Musa balbisiana* (BB), soit de la seule espèce *M. acuminata* (AA) (Koumba-Koumba et Obamé, 1989 ; Lassoudière, 2007). Le bananier plantain (*Musa x paradisiaca* L.) est une banane consommée sous forme cuite qui contribue à la sécurité alimentaire et aux revenus des populations de l'Afrique subsaharienne (Youmbi et al., 2005). Cette plante est cultivée dans plusieurs régions du Bénin et sur les quatre variétés cultivées dans ce pays (Orishele, Aloga, Avlan, FHIA 25), Avlan et Aloga sont des variétés d'introduction très ancienne et sont considérées comme des variétés locales, Orishele et FHIA 25 sont des variétés introduites récemment. Le développement de la culture de cette plante est limité par de nombreuses maladies fongiques, bactériennes et virales et par des ravageurs tels que des insectes et des nématodes (Van den houwe et Swennen, 1998). Les plus graves maladies de cette plante sont la cercosporiose, la fusariose et le bunchy-top. Les techniques classiques d'hybridation basées sur la fertilité résiduelle de certains triploïdes ont été expérimentées depuis de nombreuses années sans réel succès (Rowe, 1983). La plupart des cultivars de banane produit des fruits aspermes. Leur propagation se fait à partir de rejets issus de la plante mère et qui constituent le matériel de plantation classique. Cette voie de multiplication naturelle est lente, laborieuse et produit des rejets en quantité réduite et surtout de faible qualité phytosanitaire (Koné et al., 2010). La qualité sanitaire du matériel végétal utilisé en bananeraies est un gage de leur pérennisation. Par ailleurs, il est difficile d'obtenir des rejets dont la disponibilité est due aux variations climatiques.

Devant le quasi-échec des méthodes classiques pour l'amélioration du bananier et du plantain, les techniques de culture *in vitro* des tissus et organes végétaux constituent une véritable alternative pour mettre à la disposition des producteurs du matériel de plantation de qualité et en temps opportun. En effet, l'utilisation de vitroplants permet de disposer au champ d'un matériel sain, en particulier indemne de nématodes, de virus et de bactéries (Lassois et al., 2009). Plusieurs études précédentes avaient déjà abordé la multiplication *in vitro* du bananier et du plantain (Toklo, 2000 ; Lee, 2003 ; Mbanaso et al., 2006 ; Kalimuthu et al., 2007). Mais au Bénin, aucune étude ne s'est intéressée à la multiplication *in vitro* de bananier plantain. Vu que l'aptitude d'une plante à être cultivée *in vitro* dépend de plusieurs facteurs que sont le génotype (Arzani et Mirodjagh, 1999 ; Schween et Schwenkel, 2003 ; Gandonou et al., 2005), l'âge de l'explant (Caswell et al., 2000 ; Delporte et al., 2001) et la composition du milieu de culture (Murashige et Skoog, 1962 ; Saharan et al., 2004 ; Ahanhanzo et al., 2008), il est important de mettre au point une technique qui permet de multiplier *in vitro* les variétés de bananier et de plantain cultivées au Bénin. Cette étude se situe dans ce cadre et vise à mettre au point une technique de culture *in vitro* permettant de multiplier efficacement les génotypes de bananier plantain cultivés au Bénin.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de la variété de plantain Aloga. Les rejets ont été prélevés dans la région d'Allada, grande productrice de cette variété.

Méthodes

Les rejets de cette variété de plantain ont été plantés dans le jardin du Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, (FAST/UAC) situé à Abomey-Calavi, pendant plusieurs mois en vue de l'obtention d'un nombre suffisant de rejets nécessaires pour les essais de mise au point de la méthode de micropropagation.

Les apex de jeunes rejets sont prélevés et désinfectés dans l'alcool à 96° pendant quelques secondes puis dans une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium ou eau de javel (1%) pendant 15 minutes. Les apex sont rincés par 3 bains successifs dans de l'eau distillée stérile à raison de 10 minutes par rinçage. Les bourgeons apicaux constituant les explants sont alors prélevés aseptiquement et déposés verticalement dans des bocaux (80 mm x 150 mm) contenant 40 ml de milieu de culture à raison d'un explant par bocal.

Le milieu de culture utilisé est constitué par le milieu de Murashige et Skoog (1962) modifié et additionné de différentes concentrations d'ANA et de BAP. Le milieu d'induction et de multiplication contient l'AIA (10^{-6} N) et la BAP (0.02 N) ; tandis que le milieu d'enracinement est composé de BAP (0.001 N) et de l'ANA (10^{-6} N). Ces milieux sont ceux utilisés par Vuylsteke (1998). Le pH des milieux est ajusté à $5,7 \pm 0,1$ avec une solution de NaOH (0,1 N) avant l'addition du saccharose (30 g/l). Les milieux ont été solidifiés par l'agar (8 g/l) avant leur stérilisation pendant 15 minutes à 121 °C dans un autoclave. Les cultures ont été placées dans une chambre de culture dont la température est maintenue à 25 ± 1 °C pourvue de lampes assurant un éclairage d'environ 5.000 lux. La photopériode est de 12 heures de lumière par jour.

Les essais ont été suivis toutes les semaines et les repiquages ont été effectués toutes les quatre semaines. Les plantes bien développées sont transférées sur le milieu d'enracinement après deux à trois mois de culture. Les plantes bien enracinées ont été alors transférées en pots contenant du sol stérilisé dans la chambre de culture pour l'acclimatation qui a été effectuée par la méthode décrite par Paulet et Glaszmann (1994) et utilisée par Gandonou et al. (2005). Pour cela, les feuilles sont coupées et les plantes sont placées dans des pots contenant du sol stérilisé. Après huit à douze semaines de culture dans la chambre de culture, elles sont placées dans une serre pendant quatre à six semaines avant d'être transférées dans le jardin en plein champ.

RESULTATS

Développement et multiplication des jeunes plantes

Après 3 à 4 semaines de culture, on a noté l'apparition des premiers bourgeons adventifs sur les explants. Les repiquages successifs des explants sur des milieux frais ont entraîné la multiplication des bourgeons et l'obtention d'un nombre important de jeunes plantes à partir des bourgeons allant jusqu'à 8 plantes par explant et par mois (Photo 1).

Enracinement des plantes

Le transfert des plantes obtenues sur le milieu d'enracinement a permis le développement des racines (Photos 1 et 2). Après l'apparition des racines, le repiquage des cultures sur des milieux frais a permis un développement plus important des racines.

Acclimatation des vitroplants obtenus

Les plantes vigoureuses obtenues après 4 à 5 mois de culture *in vitro* sont transférées en pots pour l'acclimatation. Elles ont alors un système racinaire bien développé avec un nombre de racines supérieur à 4 et une longueur d'au moins 3 cm. Pour cela, les feuilles sont coupées et les plantes sont placées dans des pots contenant du sol stérilisé (Photos 3 : A, B et C). Les pots sont ensuite recouverts de plastic transparent (Paulet et Glaszmann, 1994) et cultivés dans la chambre de culture pendant 3 à 5 mois (Photos 4 A et B).

Le processus de l'acclimatation est présenté sur la Photo 3 et les résultats du début d'acclimatation en chambre de culture après 2 mois (8 semaines) sur la Photo 4. L'aspect des plantes 4 semaines après le transfert des vitroplants en serre est présenté sur la Photo 5. De même, l'aspect des vitroplants ayant passé environ 8 semaines (2 mois) en serre et 12 à 16 semaines (3 à 4 mois) en plein champ est présenté sur la Photo 6. Ces plantes se sont bien développées en serre et en plein champ. Les plantes obtenues ont présenté une taille moyenne de 13 cm mais allant jusqu'à 20 cm, un diamètre moyen à la base de la tige avoisinant 6 cm et un nombre de feuilles vertes de l'ordre de 5 après environ 12 mois de culture (Tableau 1).

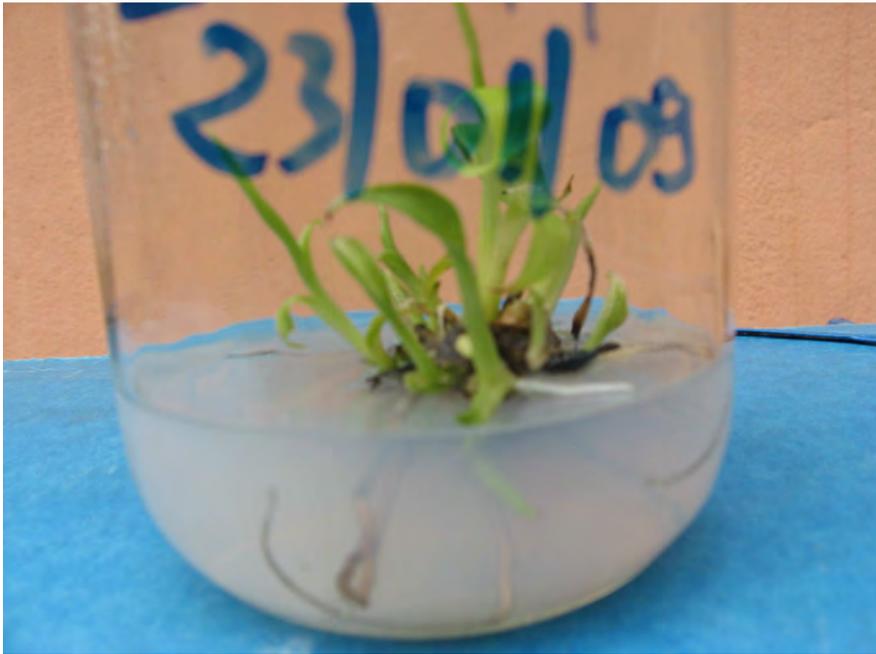
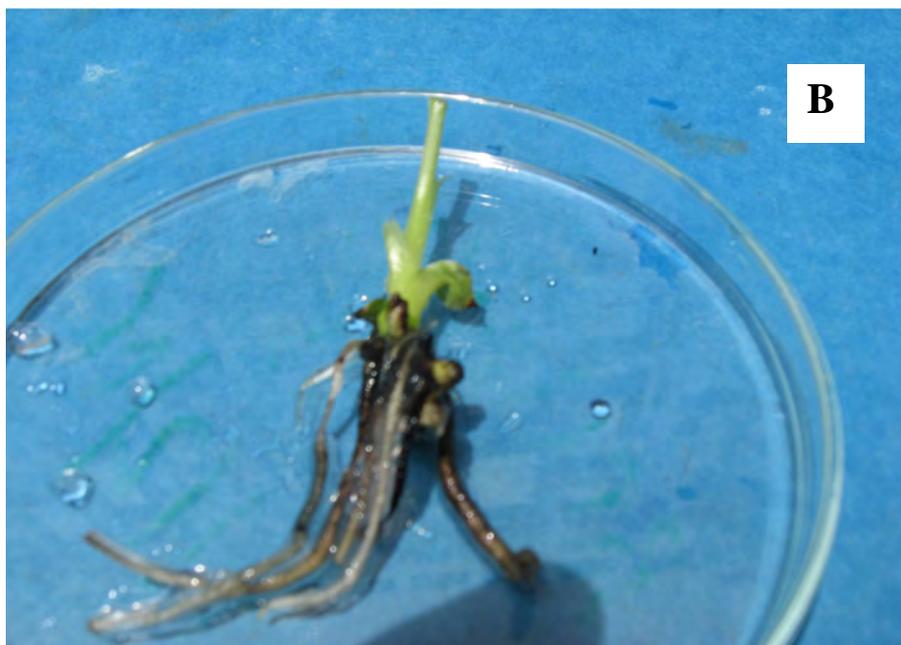


Photo 1 : Rejets de plantain obtenus *in vitro* sur milieu de multiplication (2 mois) après transfert sur le milieu d'enracinement (1 mois).



Photo 2 : Détail du système racinaire d'un vitroplant de plantain (variété Aloga).





Photos 3: Préparation des vitroplants de plantain (variété Aloga) pour l'acclimatation : (A) Vitroplants sortis de la boîte de culture ; (B) Coupure des feuilles avant la mise en acclimatation ; (C) Vitroplant mis en pot pour le début de l'acclimatation.





Photos 4 : Vitroplants en acclimatation dans la chambre de culture après 2 mois : (A) pot couvert par le plastic transparent ; (B) pots avec le plastic enlevé.



Photo 5: Vitroplants de plantain (variété Aloga) obtenus après environ 9 mois (4 à 5 mois *in vitro*, 3 mois en chambre de culture et 1 mois en serre).



Photo 6: Vitroplant de plantain (variété Aloga) obtenu après environ 13 mois (4 à 5 mois *in vitro*, 3 mois en chambre de culture, 2 mois en serre et 3 à 4 mois en plein champ).

Tableau 1: Quelques caractères quantitatifs des vitroplants de la variété Aloga après 12 mois de culture (moyenne \pm écart type).

Paramètres	Valeurs
Hauteur des plantes	13,21 \pm 5,08
Circonférence du tronc à la base	5,6 \pm 1,67
Nombre de feuilles vertes	5 \pm 1,34

DISCUSSION

Cette étude a abordé la mise au point d'une technique de multiplication *in vitro* du bananier plantain au Bénin et sur une variété locale : Aloga. Plusieurs travaux ont abordé la multiplication *in vitro* du bananier ou bananier plantain à partir d'apex (Madhulatha et al., 2006 ; Mbanaso et al., 2006). Cette étude, qui est la première réalisée sur les variétés locales, a permis de réussir à cultiver *in vitro* le plantain et à obtenir de nombreux vitroplants à partir d'apex caulinaires de jeunes rejets. Nous avons également réussi à acclimater ces plantes qui ont été transférées en plein champ avec succès. Le nombre de vitroplants obtenu par mois *in vitro* atteint 8 plantes par explant.

Chez de nombreux génotypes de *Musa*, il a été rapporté un taux mensuel de multiplication *in vitro* compris entre 2 et 10 plantes par explant (Côte et al., 1990 ; Talengera et al., 1994). Chez l'hybride FHIA-21, Jiménez Terry et al. (2004) et Kalimuthu et al. (2007) ont obtenu un taux de multiplication compris entre 1 et 5 toutes les trois ou quatre semaines. Ceci indique que les taux de multiplication obtenus dans notre étude restent globalement dans la fourchette généralement observée. Toutefois, ces valeurs restent en-dessous de celles obtenues par Vuylsteke et al. (1991) chez de nombreux cultivars de plantain. En effet, ces auteurs ont obtenu des taux mensuels de multiplication de 12,4 ; 15,3 ; 16,5 et 20,8 respectivement chez les cultivars Bobby

Tannap, Big Ebanga, Agbagba et Ubok Iba. Par ailleurs, Youmbi et Ngaha (2004) ont utilisé avec succès les bourgeons axillaires pour la micropropagation du bananier plantain. Ces auteurs ont montré que la prolifération des bourgeons axillaires était plus précoce que celle des bourgeons caulinaires. Il est donc important, après la mise au point de la technique pour la variété Aloga du Bénin, qu'elle soit améliorée en particulier dans le sens de l'optimisation du taux de multiplication *in vitro* et qu'elle soit élargie à toutes les autres variétés de bananier et de plantain cultivées au Bénin. Toutefois, la possibilité de produire plus d'un million de plantes de banane plantain par an et par explant de départ grâce à cette technique constitue une véritable opportunité pour le développement de la culture du bananier plantain dans notre pays.

Conclusion

Le présent travail a permis de mettre au point la culture *in vitro* du bananier plantain au Bénin avec des résultats satisfaisants aussi bien en culture *in vitro* qu'en acclimatation. Nous avons pu obtenir jusqu'à 8 rejets par explant en particulier après le deuxième mois de culture *in vitro*. Cette étude ouvre la voie au développement de la micropropagation du bananier plantain au Bénin dans le but de fournir aux producteurs du matériel de plantation sain et en quantité suffisante.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Professeur Jeanne ZOUNDJIHEKPON du Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Université d'Abomey-Calavi (République du Bénin) pour les corrections apportées à la première version du manuscrit. Ce travail a été financé par le programme « VITROPLANTS » du Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST), Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

REFERENCES

- Ahanhanzo C, Agbangla C, Dangou J, Toukourou F, Dansi A, Montcho D. 2008. Influence du chlorure mercurique et de la cytokinine sur la survie et la morphogenèse *in vitro* d'explants de différents géotypes d'igname (*Dioscorea* spp). *Annales des Sciences Agronomiques du Bénin*, **11**(1): 33-47.
- Arzani A, Mirodjagh SS. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **58**: 67-72.
- Caswell K, Leung N, Chibbar RN. 2000. An efficient method for *in vitro* regeneration from immature inflorescence explants of Canadian wheat cultivars. *Plant cell Tiss. Org. Cult.*, **60**: 69-73.
- Côte F, Alvard D, Domergue R, Navaroo-Mastache LC, Teisson C. 1990. Micropropagation *in vitro* du bananier. *Fruits*, **45**(N° spécial): 112-118.
- Delporte F, Mostade O, Jacquemin JM. 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **67**: 73-80.
- Gandonou C, Errabii T, Abrini J, Idaomar M, Chibi F, Skali Senhaji N. 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). *African Journal of Biotechnology*, **4**(11): 1250-1255.
- Jiménez TFA, Ramírez AD, Agramonte PD. 2004. Utilisation du Biobras-6 dans la micro-propagation du bananier plantain FHIA-21. *Info. Musa.*, **13**(1): 4-6.
- Kalimuthu K, Saravanamumar M, Senthilkumar R. 2007. *In vitro* micropropagation of *Musa sapientum* L. (Cavendish Dwarf). *African Journal of Biotechnology*, **6**(9): 1106-1109.
- Koné T, Koné M, Koné D, Kouakou TH, Traoré S, Kouadio YJ. 2010. Effet de la photopériode et des vitamines sur la micropropagation du bananier plantain (*Musa* AAB) à partir de rejets écailles de

- rangl. *Journal of Applied Biosciences*, **26**: 1675–1686.
- Koumba-Koumba D, Obamé L. 1989. La vitroculture des bananiers et plantains (*Musa* sp.) au Gabon. In *Actes du Symposium International de Yamoussoukro*, Amadou TB, Mbaye N (eds). Côte d'Ivoire ; 687-693.
- Lassois L, Busogoro J-P, Jijakli H. 2009. La banana: de son origine à sa commercialisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**(4): 575-586.
- Lassoudière A. 2007. *Le Bananier et sa Culture*. Collection Savoir Aire, Éditions Quae: Versailles, France; 384.
- Lee SW. 2003. Micropropagation of Cavendish Banana in Taiwan. *Ed. Technical Bulletin (ASPAC/FFTC)*, **163**: 1-7.
- Lescot T. 2006. La banane en chiffres. Le fruit préféré de la planète. *Fruit Trop.*, **140**: 5-9.
- Madhulatha P, Kirubakaran SI, Sakthivel N. 2006. Effects of carbon sources and auxins on *in vitro* propagation of banana. *Biologia Plantarum*, **50**(4):782-784.
- Mbanaso ENA, Crouch J, Onofeghara F. 2006. Effet de fragmentation et de l'incision sur la culture d'apex de différents génotypes de bananiers à cuire. *Info. Musa.*, **15**(1-2): 30-32.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-479.
- Paulet P, Glaszmann C. 1994. Les biotechnologies en soutien à la diffusion variétale chez la canne à sucre. *Agriculture et Développement*, **2**: 1-6.
- Rowe P. 1983. L'hybridation pour l'amélioration des plantains et autres bananes à cuire. *Fruits*, **38**(4): 256-260.
- Saharan V, Yadav RC, Yadav RN, Chapagain BP. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Afr. J. Biotechnol.*, **3**(5): 256-259.
- Schween G, Schwenkel H-G. 2003. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in greenhouse of *Primula* ssp. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **72**: 53-61.
- Talengera D, Magambo MJS, Rubaihayo PR. 1994. Testing for a suitable culture medium for micropropagation of East African highland bananas. *African Crop Science Journal*, **2**: 17-21.
- Toklo M. 2000. Contribution à la micropropagation, la vitromycorhisation et la bactérisation du bananier (*Musa* sp) et de l'igname (*Dioscorea* sp). Thèse de 3^{ème} cycle pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Complexe d'Agadir, Royaume du Maroc, p.104.
- Van den houwe I, Swennen R. 1998. La collection mondiale du bananier (*Musa* spp.) au Centre de Transit de l'INIBAP à la K.U. Leuven: stratégies de conservation et mode d'opération. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2**(1): 36-45.
- Vuylsteke DR. 1998. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and distribution of *Musa* germplasm. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. p. 82.
- Vuylsteke D, Swennen R, De Langhe E. 1991. Somaclonal variation in plantains (*Musa* spp., AAB group) derived from shoot-tip culture. *Fruits*, **46**: 429-439.
- Youmbi E, Ngaha D. 2004. Expression *in vitro* des capacités organogènes des bourgeons axillaires chez le bananier plantain (*Musa* spp.). *Fruits*, **59**(4): 241-248.
- Youmbi E, Fonkam NJ, Ngaha D, Nkeng MN, Kwa M. 2005. Comportement de vitroplants de bananiers plantains issus de bourgeons axillaires et apicaux au cours de l'acclimatation et en champ. *Fruits*, **60**(2): 91-100.