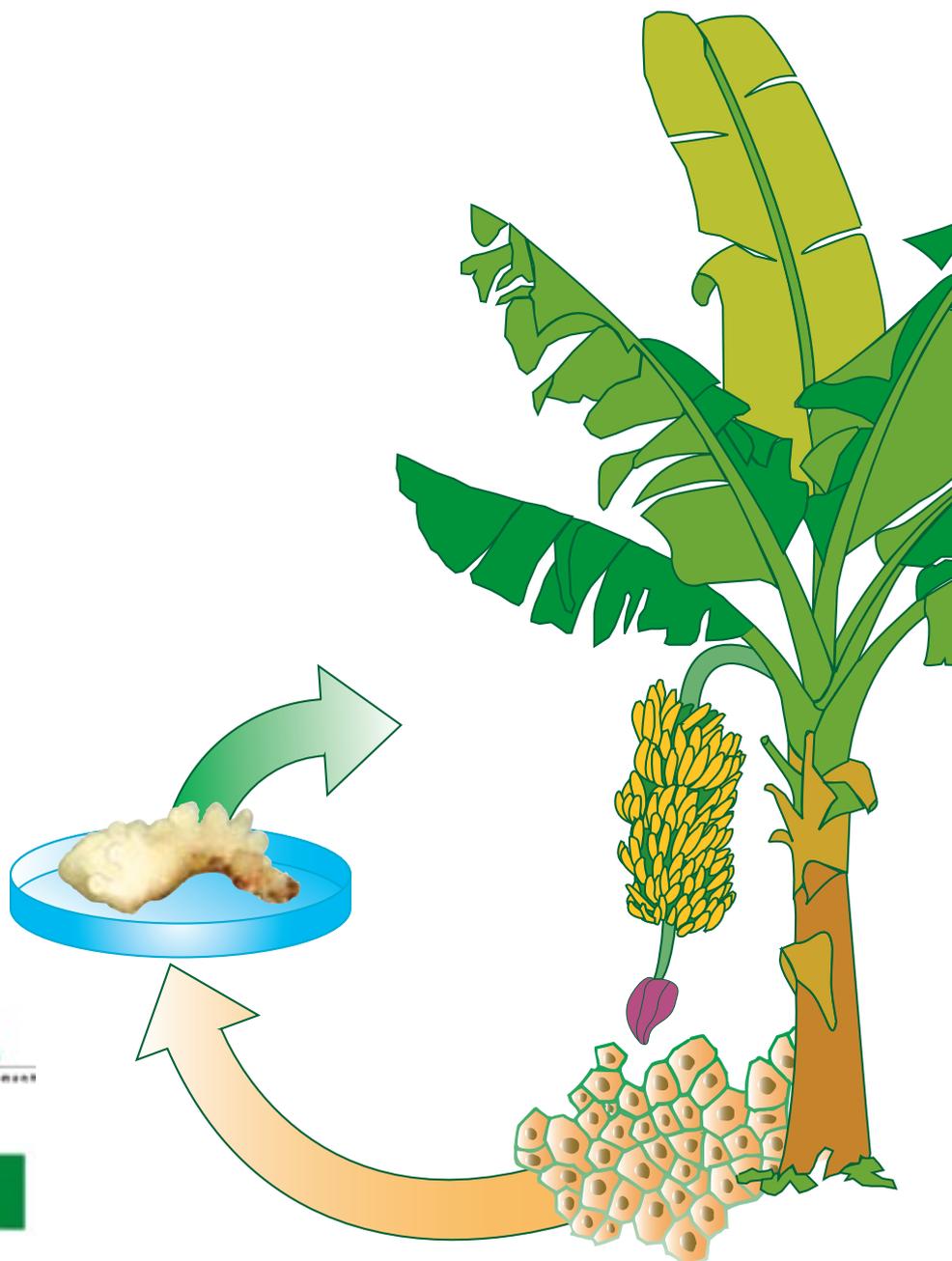


Suspensions cellulaires embryogènes de bananiers et bananiers plantain

Hannelore Strosse, Régis Domergue,
Bart Panis, Jean-Vincent Escalant et François Côte



La mission du **Réseau international pour l'amélioration de la banane et la banane** (INIBAP) plantain est d'accroître la production et la stabilité de la banane et de la banane plantain de consommation locale au profit des petits producteurs.

L'INIBAP a quatre objectifs principaux :

Organiser et coordonner l'effort global de recherche sur la banane et la banane plantain pour le développement, l'évaluation et la dissémination de matériel génétique de *Musa* amélioré et la conservation et l'utilisation de la diversité génétique des *Musa*;

Promouvoir et renforcer les efforts régionaux pour résoudre les problèmes spécifiques à chaque région et aider les programmes nationaux à participer et bénéficier de l'effort global de recherche;

Renforcer la capacité des SNRA à conduire des recherches sur les bananes et les bananes plantain;

Coordonner, faciliter et appuyer la production, la collecte et l'échange d'information et de documentation sur la banane et la banane plantain.

L'INIBAP est un programme de l'Institut international des ressources phylogénétiques (IPGRI), un centre *Future Harvest*.

L'**Institut international des ressources phylogénétiques** (IPGRI) est un organisme scientifique indépendant à caractère international visant à promouvoir la conservation et l'utilisation des ressources phylogénétiques au profit des générations actuelles et futures. Il est un des 16 centres *Future Harvest* fonctionnant sous l'égide du Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale (GCRAI), une association de membres des domaines privés et publics qui soutiennent les efforts pour utiliser la science de pointe pour réduire la faim et la pauvreté, améliorer l'alimentation et la santé, et pour protéger l'environnement. L'IPGRI a son siège social à Maccarese, près de Rome, en Italie, et possède des bureaux régionaux dans plus de 20 pays à travers le monde. Il fonctionne sur la base de trois programmes : (1) le programme des ressources phylogénétiques, (2) le programme des ressources génétiques du GCRAI (3) et le Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain (INIBAP).

Le statut international a été conféré à l'IPGRI au titre d'un accord d'établissement qui, en janvier 2003, avait été signé par les gouvernements des pays suivants: Algérie, Australie, Belgique, Bénin, Bolivie, Brésil, Burkina Faso, Cameroun, Chili, Chine, Congo, Costa Rica, Côte d'Ivoire, Chypre, Danemark, Egypte, Equateur, Grèce, Guinée, Hongrie, Inde, Indonésie, Iran, Israël, Italie, Jordanie, Kenya, Malaisie, Maroc, Mauritanie, Norvège, Ouganda, Pakistan, Panama, Pérou, Pologne, Portugal, République Tchèque, République Slovaque, Roumanie, Russie, Sénégal, Soudan, Suisse, Syrie, Tunisie, Turquie, et Ukraine.

Pour mener à bien son programme de recherche, l'IPGRI reçoit une aide financière de plus de 150 donateurs, incluant des gouvernements, des fondations privées et des organismes internationaux. Pour plus de renseignements sur les donateurs et les activités de recherche, consultez les rapports annuels de l'IPGRI. Des copies imprimées sont disponibles sur demande à ipgri-publications@cgiar.org ou à partir du site web de l'IPGRI (www.ipgri.cgiar.org).

Les appellations employées dans cette publication et la présentation des données et cartes qui y figurent n'impliquent de la part de l'IPGRI et du GCRAI aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les opinions exprimées sont celles des auteurs et ne reflètent pas nécessairement celles de l'IPGRI ou du GCRAI.

La mention d'une marque commerciale ne constitue pas un endossement du produit et est offerte seulement à titre d'information.

Le **Centre technique de coopération agricole et rurale** (CTA) a été créé en 1983 dans le cadre de la Convention de Lomé entre les Etats du groupe ACP (Afrique, Caraïbes, Pacifique) et les pays membres de l'Union européenne. Depuis 2000, le CTA exerce ses activités dans le cadre de l'Accord de Cotonou ACP-CE.

Le CTA a pour mission de développer et fournir des services qui améliorent l'accès des pays ACP à l'information pour le développement agricole et rural, et de renforcer les capacités de ces pays à produire, acquérir, échanger et exploiter l'information dans ce domaine. Les programmes du CTA sont articulés sur quatre axes principaux : l'élaboration des stratégies de gestion de l'information et de partenariats nécessaires à la formulation et la mise en œuvre des politiques, l'encouragement des contacts et des échanges d'expérience, la fourniture d'information sur demande aux partenaires ACP et le renforcement de leurs capacités en information et communication.

Citation:

Stosse H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant et F. Côte. 2003. Suspensions cellulaires embryogènes de bananiers et bananiers plantain (A. Vézina et C. Picq, eds). Guides techniques INIBAP 8. Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Montpellier, France.

INIBAP ISBN : 2-910810-64-x

ISSN : 1560-3873

© International Plant Genetic Resources Institute, 2003

IPGRI
Via dei Tre Denari 472/a
00057 Maccarese (Fiumicino)
Rome, Italie

INIBAP
Parc Scientifique Agropolis II
34397 Montpellier Cedex 5
France

CTA
Postbus 380
6700 AJ Wageningen
Pays-Bas



Suspensions cellulaires embryogènes de bananiers et bananiers plantain

Hannelore Strosse¹, Régis Domergue²,
Bart Panis¹, Jean-Vincent Escalant³ et François Côte²

Anne Vézina³ et Claudine Picq³, éditeurs

¹ KULeuven, Laboratory of Tropical Crop Improvement,
Kasteelpark Arenberg 13, B-3001 Leuven, Belgique

² Cirad, laboratoire Biotrop, Avenue Agropolis,
34398 Montpellier Cedex 5, France

³ Inibap, Parc Scientifique Agropolis 2,
34397 Montpellier Cedex 5, France



Préface

Les protocoles de ce guide technique ont été préparés par des chercheurs du *Laboratory of Tropical Crop Improvement* de KULeuven et du laboratoire de biologie cellulaire du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Cirad, laboratoire Biotrop).

Sommaire

Introduction	5
1. L'embryogenèse somatique	6
Induction du cal	6
Préparation de l'explant initial	6
Induction de l'embryogenèse	9
Formation du cal	10
Initiation d'une suspension cellulaire	11
Sélection d'un cal embryogène	11
Repiquages et amélioration de la qualité	12
Maintenance d'une suspension cellulaire	13
Régénération	14
Développement des embryons	14
Germination d'embryons	14
Régénération en plantules	15
2. Critères d'évaluation	21
Formation de cals idéaux	21
Etablissement de suspensions cellulaires embryogènes	21
Formation d'embryons	21
Potentiel de régénération	21
3. Les limites de l'embryogenèse somatique	24
Conditions de culture	24
Variation somaclonale	25
Références	26
Annexe 1. Acronymes	28
Annexe 2. Milieux de culture	29
Annexe 3. Liste des cultivars ayant donné des cals embryogènes ou des suspensions cellulaires embryogènes	31

Introduction

À l'origine, les techniques d'embryogenèse somatique ont été envisagées pour deux objectifs principaux : la micropropagation de masse d'une part, et le développement d'outils cellulaires pour l'amélioration génétique d'autre part (par ex., la transformation génétique et la fusion de protoplastes). Ces techniques reposent sur l'utilisation de régulateurs de croissance synthétiques (auxines) pour induire la dédifférenciation des tissus et la formation de tissus (cals) embryogènes. Le cal embryogène est le matériel de départ pour le développement de suspensions cellulaires embryogènes (SCE). À partir de ces suspensions, le développement d'embryons puis la régénération de plantules sont réalisées.

La technique des SCE n'est pas encore opérationnelle comme méthode de micropropagation de masse malgré l'important potentiel de régénération qu'elle permet. La principale raison est l'incidence plus élevée de variation somaclonale observée avec les techniques d'embryogenèse somatique comparativement à celle observée avec la technique classique de multiplication d'apex. Les SCE sont toutefois d'ores et déjà utilisées pour la transformation génétique ou la fusion de protoplastes de bananiers. Les plantes régénérées à partir d'une SCE sont souvent issues d'une cellule unique. Ceci permet d'éviter, dans le cas des plantes transformées, le problème des plantes chimériques, (plantes comprenant des cellules génétiquement modifiées et des cellules non transformées) qui survient lorsque des méristèmes sont utilisés comme matériel de départ pour la transformation.

Quatre méthodes d'embryogenèse somatique ont été testées chez le bananier. Chacune utilise un type d'explant différent : des embryons zygotiques (Cronauer et Krikorian 1988, Escalant et Teisson 1989), des tranches de rhizome et des gaines de feuilles (Novak *et al.* 1989), des fleurs mâles/femelles immatures (Ma 1991, Escalant *et al.* 1994, Grapin *et al.* 1996, Grapin *et al.* 1998) et des cultures de méristèmes proliférantes (scalps) (Dhed'a *et al.* 1991, Schoofs 1997). Le plus souvent, les SCE sont initiées à partir de fleurs mâles immatures ou de scalps.

Une percée majeure en matière d'embryogenèse somatique des bananiers, qui a d'ailleurs inspiré de nombreuses études, revient au professeur Ma de l'Université de Taiwan qui a mis au point le milieu de culture et la méthodologie pour obtenir des SCE à partir de fleurs mâles (Ma 1991). Les premières étapes, jusqu'à la formation du cal embryogène, ont été décrites par Escalant *et al.* (1994). Par ailleurs, Grapin *et al.* (1996) et Côte *et al.* (1996) décrivent l'initiation et la maintenance des suspensions cellulaires ainsi que les étapes de régénération. La méthode de Ma a également été utilisée avec des fleurs immatures femelles pour les cultivars ne produisant pas de fleurs mâles (Grapin *et al.* 2000).

La méthode des scalps utilisée à la *Katholieke Universiteit Leuven* (KULeuven) repose sur des cultures hautement proliférantes initiées à partir d'apex. Cette méthode a été décrite pour la première fois par Dhed'a (1992) et optimisée par Schoofs (1997).

Dans ce guide technique, seules les méthodes des fleurs mâles immatures et des scalps sont décrites car elles s'appuient sur de nombreuses publications et ont été reproduites dans plusieurs laboratoires. Ils sont suivis par des sections expliquant les critères utilisés pour évaluer la qualité d'une suspension embryogène et les difficultés et limites de développement de l'embryogenèse somatique chez les bananiers.

1. L'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique, à partir de fleurs mâles ou de scalps, est illustrée dans la Figure 1 et détaillée ci-après. « L'explant initial » se réfère à l'explant qui se développe en un cal embryogène lorsqu'il est placé dans un milieu de culture qui induit la formation de cals. Suivant la méthode adoptée, l'explant initial est une fleur immature ou un scalp dérivé d'un apex. Mais bien que les fleurs immatures soient directement prélevées sur le bourgeon mâle, une phase de culture *in vitro* est nécessaire pour obtenir un explant initial lorsque la méthode des scalps est utilisée.

Ces deux méthodes diffèrent seulement dans les premières étapes conduisant à la formation d'un cal embryogène. De ce fait, les protocoles pour chaque méthode sont présentés en parallèle, suivis d'un protocole commun dans lequel les particularités propres à chaque méthode sont mentionnées.

Induction du cal

Préparation de l'explant initial

Méthode des scalps

Méthode des fleurs immatures

Matériel de départ

Des apex indexés pour les virus (Diekmann et Putter 1996) sont utilisés comme matériel de départ. Ils proviennent soit de vitroplants enracinés (Figure 2), soit de plants cultivés en serre ou en champ, et dont la surface a été stérilisée (Hamill *et al.* 1993).

Enlever les racines et les feuilles et couper 0,5 cm au-dessus du méristème apical (Figure 3). Des incisions longitudinales peuvent favoriser la multiplication de pousses individuelles.

Utiliser des bourgeons mâles (Figure 8) prélevés 1 à 10 semaines après la floraison. Les bourgeons peuvent être gardés pendant 24 h avant l'inoculation des fleurs immatures. Des fleurs femelles peuvent être utilisées lorsque le cultivar ne produit pas de fleurs mâles, comme chez les plantains de type Horn. Dans ce cas, le bourgeon est prélevé à l'intérieur du pseudo-tronc avant la floraison. La méthode est décrite dans Grapin *et al.* 2000.

Dans des conditions non aseptiques, réduire la taille du bourgeon mâle jusqu'à ce que l'explant mesure 0,8 cm x 2 cm (Figure 9). Le bourgeon ainsi réduit est gardé dans des conditions humides, c'est à dire dans un récipient contenant quelques gouttes d'eau et scellé par un film plastique.

Méthode des scalps

Méthode des fleurs immatures

Stérilization

Vérifier la présence de bactéries à croissance lente. Bien qu'elles n'interfèrent généralement pas dans la multiplication *in vitro* de pousses, ces bactéries peuvent être problématiques dans les stades ultérieurs d'initiation de la suspension cellulaire. Couper une tranche à la base du corne et frottez-la sur le milieu bactériologique. Incuber à 28°C pendant 4 à 6 semaines et examiner le milieu de culture pour la présence de colonies de bactéries (Vandenhouwe *et al.* 1998).

Les bourgeons réduits sont superficiellement stérilisés dans de l'alcool éthylique à 70% pendant 1 minute (Figure 10). Il n'est pas nécessaire de les rincer dans de l'eau distillée. Le temps entre la désinfection et l'inoculation doit être inférieur à 1 heure.

Inoculation

Inoculer les explants sur 25 ml de milieu P5 (Tableau 1, Annexe 2) dans des tubes à essai de 150 ml (1 explant/tube) ou dans des petits pots de nourriture pour bébés (3 à 5 explants/pot). Les explants sont cultivés dans des **conditions standard**: 27°C sous une intensité lumineuse continue de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ou une photopériode de 12 h et une humidité relative de 70%.

Un mois plus tard, évaluer le matériel de départ et choisir le milieu de prolifération à utiliser pour les repiquages, en fonction de la capacité de prolifération du clone (pour un descriptif détaillé des différentes classes de prolifération, voir Schoofs 1997).

Pour les cultivars à fort potentiel de prolifération (la plupart de ces cultivars appartiennent au groupe ABB), des amas de petites pousses et des groupes contenant jusqu'à une vingtaine de méristèmes serrés les uns contre les autres devraient se voir à la base de l'explant 1 mois après inoculation sur milieu P5 (Figure 4). Ces cultivars

Aller à la section «Induction de l'embryogenèse».

Méthode des scalps

doivent être conservés sur milieu P5 jusqu'à la production de cultures de méristèmes en chou-fleur.

Pour les cultivars à potentiel de prolifération faible ou modéré (la plupart des bananiers et plantains), des touffes de petites pousses et de plantules enracinées, sans formation de méristèmes à la base de la feuille, se formeront 1 à 3 mois après inoculation sur milieu P5 (Figure 5). Ces cultivars ont besoin d'être transférés sur un milieu P4 (Tableau 1, Annexe 2) pour obtenir des cultures de méristèmes en chou-fleur (Figure 6).

Méthode des fleurs immatures

Repiquage

Une fois par mois, sélectionner des petites pousses qui ont des groupes de méristèmes à la base de la feuille jusqu'à ce que ceux-ci mesurent 0,5 cm de diamètre et puissent être cultivés séparément. Les conditions de culture, nommées ci-après **conditions de culture 2**, sont les mêmes que les conditions standard décrites plus haut, sauf que les cultures sont gardées à l'obscurité.

Les cultures de méristèmes devraient être repiquées jusqu'à ce qu'elles forment des amas de petits méristèmes blancs entourés de seulement quelques toutes petites feuilles (Figure 6). Le nombre de repiquages recommandé varie entre les clones, mais se situe en général entre 2 et 10. Les nombres recommandés et maximum de cycles sont donnés par Schoofs (1997) pour un large spectre de cultivars. Lorsque le potentiel de prolifération diminue suite à des repiquages répétés sur

Aller à la section «Induction de l'embryogénèse».

Méthode des scalps

milieu P4, il est recommandé de faire un ou deux repiquages sur milieu P5 avant de reprendre les cultures sur milieu P4.

Méthode des fleurs immatures

Induction de l'embryogenèse

Matériel de départ

Sous une loupe binoculaire, découper des scalps de bonne qualité (de $3 \times 3 \times 3$ mm à $3 \times 3 \times 5$ mm) à partir des cultures de méristèmes (Figure 7). Ces scalps devraient avoir une forte proportion de dômes méristématiques par rapport aux tissus de corne et de feuille. Il faut éviter la présence élevée de ces tissus car le tissu du corne a tendance à enfler et le tissu foliaire à donner trop de cals aqueux.

Sous une hotte stérile, des fleurs mâles immatures provenant de bourgeons réduits et superficiellement stérilisés, sont isolées en utilisant une loupe binoculaire (Figure 11). Les fleurs immatures prélevées doivent venir des rangs 16 à 8 (1 étant la fleur immature la plus proche du dôme méristématique) (Figure 12). Utiliser un scalpel à lame fine (par exemple Feather n° 11).

Les fleurs des rangs 8 à 16 donnent les meilleurs résultats en terme d'embryogenèse. Celles des rangs inférieures ont tendance à se nécroser sur le milieu MA1, alors que celles des rangs supérieures ont tendance à produire des cals non-embryogènes.

Inoculation

Les scalps sont inoculés sur milieu semi-solide ZZ (ZZss, Tableau 1, Annexe 2) dans des tubes à essai (1 explant/tube), des petits pots de nourriture pour bébés ou des boîtes de Petri (3 à 5 explants/boîte de Petri de 9 cm), et soumis aux conditions de culture 2. On enfonce la surface coupée du scalp dans le milieu de culture, tout en s'assurant que les dômes méristématiques ne sont pas en contact direct avec le milieu de culture.

Les fleurs des rangs 8 à 16 sont cultivées sur le milieu MA1 (Tableau 2, Annexe 2) dans des petits pots de nourriture pour bébés ou des boîtes de Petri de 9 cm (Figure 13). Les cultures sont gardées à l'obscurité totale sous forte humidité (>70% HR) à 27°C.

La surface coupée est en contact avec le milieu de culture. Les récipients sont scellés avec du Parafilm® ou du papier aluminium afin d'éviter leur

Méthode des scalps

Les récipients sont scellés avec du Parafilm® ou du papier aluminium pour éviter leur dessiccation et pour réduire la contamination. Ceci est d'une grande importance vu que les scalps sont gardés sur le même milieu de culture pendant toute la phase d'induction de l'embryogenèse (3 à 8 mois).

Méthode des fleurs immatures

dessiccation (une faible humidité relative diminue les chances de succès) et pour réduire la contamination. Ceci est d'une grande importance vu que les fleurs mâles sont gardées sur le même milieu de culture pendant toute la phase d'induction de l'embryogenèse (4 à 7 mois).

Les sections suivantes sont valables pour la méthode des scalps et la méthode des fleurs immatures.

Formation du cal

Les cultures doivent être vérifiées tous les mois pendant les trois premiers mois et tous les 15 jours par la suite. L'induction de l'embryogenèse dépend du cultivar et de la méthode utilisée mais en général on peut distinguer les phases suivantes.

- De 0 à 4 semaines :
 - dédifférenciation du tissu foliaire en cal aqueux (*méthode des scalps*);
 - apparition de cals de cicatrisation (*méthodes des scalps et des fleurs immatures*);
 - l'explant de la fleur mâle s'enroule sur lui-même et devient presque circulaire.
- A environ 4 semaines :
 - apparition de globules méristématiques sur l'explant (la majorité de la surface tourne au noir ce qui est un bon signe montrant qu'il n'y a pas eu trop de tissu foliaire inoculé).
- A 6 semaines et plus :
 - enflure du tissu du corne (partie inférieure du scalp);
 - développement de cals secondaires non-embryogènes, nodulaires et jaunes (Figure 14) qui ne conviennent pas à l'initiation d'une suspension;
 - formation de globules hétérogènes;
 - formation de cals compacts (non-embryogènes) qui ne conviennent pas à l'initiation d'une suspension (Figure 15);
 - développement de cals embryogènes (CE) constitués d'embryons individuels (Figure 16) ou de cals compacts (CC) (Figure 17) qui ne conviennent pas à l'initiation d'une suspension. La fréquence la plus élevée de CE est généralement observée après 3 mois de culture (*méthode des fleurs immatures*);

- formation d'un cal embryogène friable (appelé CI pour « cal idéal ») qui porte de nombreux proembryons translucides (en général plus de 10) (Figures 18 et 19). Ce cal convient au transfert en milieu liquide. La plus haute fréquence de CI est généralement observée après 4 à 5 mois de culture (*méthode des fleurs immatures*). A titre d'information sur l'histologie d'un CI, voir Escalant *et al.* 1994 et Grapin *et al.*

• A 6-8 mois et plus :

- les globules et les cals secondaires deviennent bruns.

• A la fin de la période de culture, trois schémas principaux de développement peuvent être distingués :

- pas de réponse embryogène (50 à 100% des explants selon le cultivar et la méthode);

- des cals embryogènes comprenant des embryons individuels (en moyenne, 15% des fleurs mâles inoculées);

- des cals « idéaux » embryogènes friables (en moyenne, 0,8% des fleurs mâles inoculées ou 8% des bourgeons mâles si 10 fleurs mâles immatures par bourgeon mâle ont été inoculées).

Voir la section 2 sur les critères d'évaluation pour plus d'information sur la façon de calculer le taux de réussite de la formation de cals embryogènes.

Initiation d'une suspension cellulaire

Sélection d'un cal embryogène

L'initiation d'une suspension cellulaire embryogène (SCE) de bonne qualité dépend de la qualité et du volume du cal embryogène sélectionné en fonction de la présence de peu d'embryons développés. Une observation attentive et régulière du cal idéal est nécessaire pour la sélection de cals embryogènes qui sont à l'équilibre entre « la bonne taille » et la « bonne phase de développement ».

Choisir des tissus qui contiennent des cals hautement embryogènes et des proembryons transparents à un stade jeune. Il est important d'enlever les embryons au stade cotylédonaire, les globules méristématiques et les cals compacts.

Transférer le CI en milieu de culture liquide: ZZ liquide (ZZL, Tableau 1, Annexe 2), dans le cas de CI dérivés de scalps, ou MA2 liquide (Tableau 2, Annexe 2), dans le cas de CI dérivés de fleurs mâles.

Différents types de récipients peuvent être utilisés du moment que la densité d'inoculation minimale est respectée.

- Erlenmeyer : un complexe embryogène par flacon, 3 à 6 ml de milieu de culture ZZI par flacon. Les deux-tiers du fond du flacon doivent être recouverts par le complexe embryogène.
- Une boîte à cupules (1 cal embryogène par puits de 3 cm de diamètre, 6 à 8 ml de MA2 liquide par puits).

Couvrir le récipient avec du papier aluminium, le sceller avec du Parafilm® et mettre sur un agitateur rotatif (70 à 100 t/min) sous les conditions de culture 2.

Les CI sont friables et se désagrègent immédiatement lorsqu'ils sont placés en milieu liquide.

Repiquages et amélioration de la qualité

Le but est d'améliorer la qualité des suspensions afin d'obtenir des SCE homogènes. Un microscope inversé est utilisé pour l'observation. Lorsque suffisamment de matériel est disponible, un échantillon peut être prélevé pour observation sous un microscope optique. Une pipette permet d'enlever les composants non désirés.

0 à 3 mois après initiation

Des SCE nouvellement établies (Figure 20) comprennent :

- des agrégats de cellules embryogènes,
- des globules hétérogènes qui libèrent des amas de cellules embryogènes à leur surface,
- des petits embryons distincts et transparents qui produisent des cellules embryogènes près de leur base (Figure 21),
- des globules méristématiques vides jaunâtres et/ou des cellules denses riches en amidon (Figure 22),
- des embryons blanchâtres au stade cotylédonaire qui se dédifférencient en globules méristématiques et/ou qui libèrent des composés phénoliques qui s'oxydent, ce qui provoque un noircissement de la suspension cellulaire.

Remplacer une partie du milieu de culture tous les 7 à 10 jours. Suivant le taux de croissance de la SCE, garder entre 10 et 20% de l'ancien milieu de culture préconditionné.

Enlever les globules méristématiques jaunâtres, les embryons blanchâtres au stade cotylédonaire, les tissus nécrotiques et les cellules très vacuolées.

Chaque mois, transférer un échantillon sur un milieu bactériologique (Van Den Houwe 1998).

Transférer la SCE dans un récipient plus grand selon le taux de croissance du volume des cellules sédimentées (VCS) de la suspension.

3 mois après l'initiation jusqu'à l'établissement de la suspension cellulaire (du 6^{ème} au 9^{ème} mois)

Une SCE de 3 mois est composée:

- d'agrégats en prolifération de cellules embryogènes,

- de proembryons somatiques blanchâtres issus de la différenciation de cellules embryogènes,
- de globules méristématiques jaunâtres issus de la conversion de globules hétérogènes,
- de cellules denses blanchâtres libérées par des globules méristématiques,
- de cellules très vacuolées, libérées par des globules méristématiques.

Afin de tester la viabilité des ECS, ajouter à de l'eau distillée quelques gouttes d'une solution de diacétate de fluorescéine (FDA) (-20°C, dissout dans de l'acétone et de l'eau) jusqu'à l'obtention d'une opalescence bleue. Ajouter 1 à 2 gouttes de cette solution diluée à un échantillon de suspension. Les tissus viables émettent une fluorescence vert vif lorsqu'on les observe sous une lumière ultra-violet.

Quand le volume est suffisant, il suffit le fait de répandre une toute petite quantité de cellules sur le milieu de régénération pour déterminer de façon simple et rapide, le caractère embryogène de la suspension.

Remplacer une partie du milieu de culture tous les 10 à 14 jours. Selon le taux de croissance de la SCE, garder entre 10 et 20% du vieux milieu préconditionné.

Le volume de cellules sédimentées au début d'un repiquage doit être compris entre 1.5 et 3%. Utiliser un Erlenmeyer plus grand ou diviser les cellules entre plusieurs Erlenmeyer si nécessaire.

Enlever les globules méristématiques et les proembryons lorsqu'ils sont en grande quantité. Enlever les grands groupes de cellules en tamisant et ne garder que la fraction comprise entre 250 et 500 µm.

Chaque mois, transférer un échantillon sur un milieu bactériologique.

Maintenance d'une suspension cellulaire

Bien que les cellules de bananier se multiplient relativement facilement dans un milieu liquide, les suspensions qui en résultent peuvent avoir des potentiels de régénération variables. Georget *et al.* 2000 donnent une description histologique détaillée des différentes parties d'une SCE, de leur développement dans le temps et de leur potentiel embryogénique.

Une SCE de bonne qualité est caractérisée par :

- la présence d'une grande proportion (>80%) d'agrégats de cellules embryogènes en prolifération (Figure 23),
- une couleur qui peut aller d'un jaune vif à pâle (des suspensions blanchâtres ne sont pas désirables car ceci est souvent une indication de la présence d'une forte proportion de cellules non régénératrices riches en amidon),
- une précipitation rapide des cellules (moins d'une minute) lorsque la suspension est retirée de l'agitateur orbital, indiquant une faible proportion de débris et cellules vides,

- une viabilité supérieure à 80% des amas de cellules embryogènes, selon le test FDA,
- un taux de multiplication de 1,5 à 2 par période de 2 semaines entre repiquages,
- un potentiel élevé de régénération, par exemple de 100 à plus de 300 000 embryons par ml de cellules sédimentées.

Vérifier régulièrement la présence de contamination et le potentiel de régénération (voir la section ci-après sur la régénération) ainsi que le taux de croissance. Pour ce dernier, les paramètres suivants peuvent être pris en compte :

- volume des cellules sédimentées (VCS) (précipitation par gravité),
- volume des cellules compactées (VCC) (précipitation par centrifugation),
- poids frais et sec.

La qualité d'une SCE diminue avec le nombre de repiquages. Ceci se traduit par un risque plus élevé de contamination et une diminution du taux de croissance et du potentiel de régénération, en raison, par exemple, de la prédominance de cellules denses riches en amidon dont la croissance est rapide (Georget *et al.* 2000). Il y aurait également une relation directe entre le temps passé en culture et la variation somaclonale. Pour réduire les problèmes liés aux repiquages, un protocole de cryoconservation a été développé afin de stocker pour une période indéfinie les SCE (Panis et Thinh 2001).

Régénération

Une SCE de bonne qualité se régénère facilement en embryons somatiques et ultérieurement en plantes.

Développement des embryons

Au début d'une période de repiquage :

- transférer un échantillon représentatif de SCE dans un tube gradué et ajustez le VCS à 3% en ajoutant le milieu liquide : ZZ1 (*méthode des scalps*) ou MA2 (*méthode des fleurs immatures*) (Figure 24),
- transférer 1 ml de cette solution sur un papier filtre Whatman dans une boîte de Pétri de 9 cm contenant 25 ml de milieu de régénération: RD1 (*méthode des scalps*) ou MA3 (*méthode des fleurs immatures*),
- incuber sous les conditions standard 2.

Un à 3 mois après l'initiation, selon la SCE, les embryons en développement devraient ressembler à ceux de la Figure 25.

Germination d'embryons

Transférer un échantillon d'embryons matures (3 à 4 mois après étalement) dans une boîte de Pétri contenant 25 ml de milieu de germination : RD2 (*méthode des scalps*) ou M4 (*méthode des fleurs immatures*). Incuber en conditions standard pendant 1,5 mois afin d'obtenir des embryons ayant germé (Figure 26).

Régénération en plantules

Transférer sur un milieu P6 les embryons ayant germé. Incuber sous conditions standard pendant 1 à 1,5 mois. A ce stade, les plantules ressemblent à celles obtenues en utilisant une méthode *in vitro* classique (Figure 27).

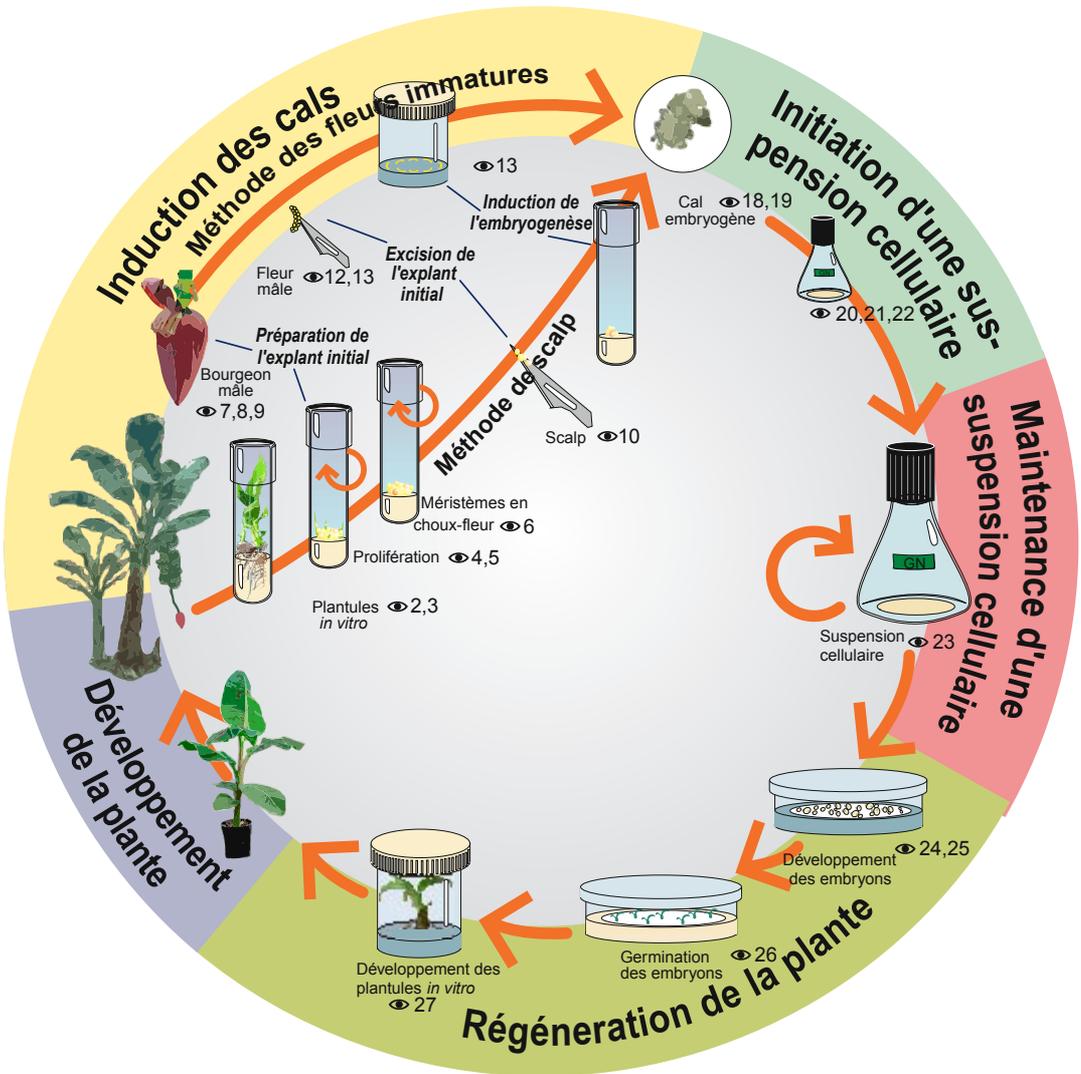


Figure 1. Etapes des deux principales méthodes utilisées pour produire des suspensions cellulaires embryogènes de bananes et bananiers plantain.

👁️ Référence aux figures.

Méthode des scalps



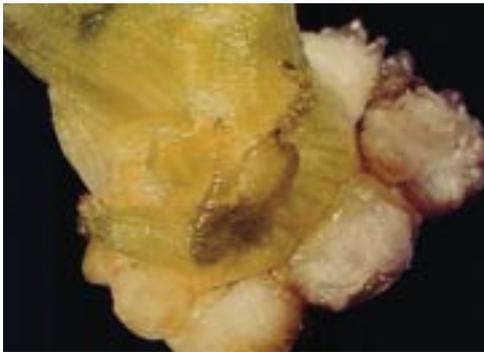
KULeuven

Figure 2. Plantes *in vitro* enracinées.



KULeuven

Figure 3. Explant initial.



KULeuven

Figure 4. Cultivars à fort potentiel de prolifération (1 mois après l'inoculation).



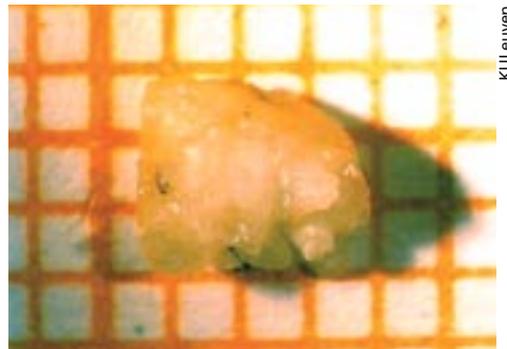
KULeuven

Figure 5. Cultivars à potentiel de prolifération faible ou modéré (1 à 3 mois après l'inoculation).



KULeuven

Figure 6. Culture de méristèmes.



KULeuven

Figure 7. Scalp excisé d'une culture de méristèmes.

Méthode des fleurs immatures



Régis Domergue, Cirad

Figure 8. Bourgeons mâles.



Régis Domergue, Cirad

Figure 9. Préparation de l'explant initial.



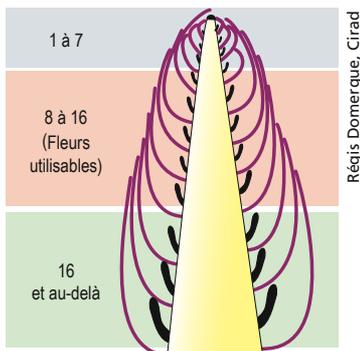
Régis Domergue, Cirad

Figure 10. Bourgeons superficiellement stérilisés.



Régis Domergue, Cirad

Figure 11. Isolement de l'explant initial.



Régis Domergue, Cirad

Figure 12. Disposition des fleurs dans le bourgeon mâle.



Figure 13. Inoculation des fleurs masculines.

Cals



KULeuven

Figure 14. Cals non-embryogènes, nodulaires et jaunes.



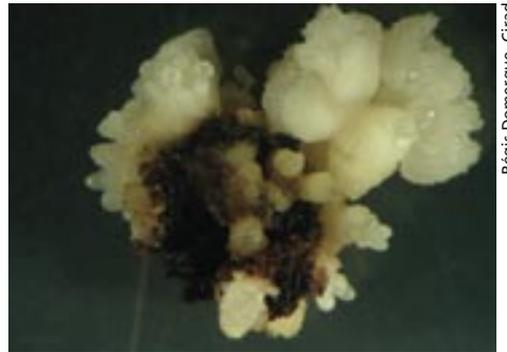
KULeuven

Figure 15. Cals compacts (non-embryogènes).



KULeuven

Figure 16. Embryons individuels.



Régis Domergue, Cirad

Figure 17. Embryons et cal compact.



Régis Domergue, Cirad

Figure 18. Cal idéal.



KULeuven

Figure 19. Cal idéal avec proembryons translucides.

Suspensions cellulaires et régénération



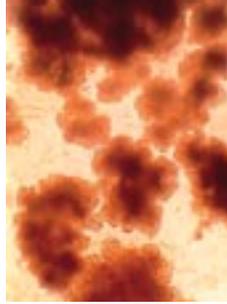
KULeuven

Figure 20. SCE nouvellement établies.



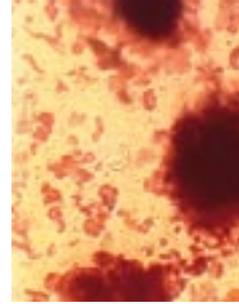
KULeuven

Figure 21. Embryon transparent.



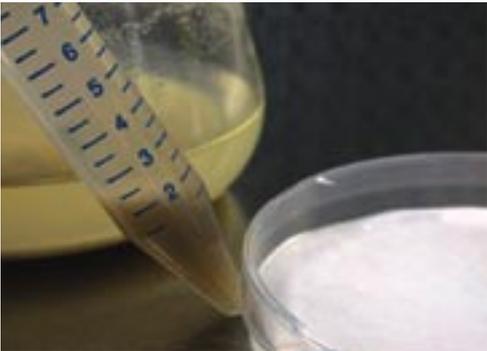
KULeuven

Figure 22. Globules méristématiques jaunâtres.



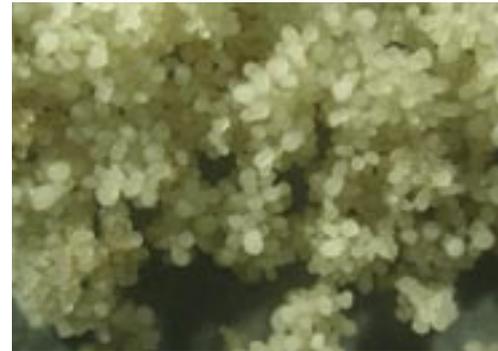
KULeuven

Figure 23. Agrégats de cellules embryogènes en prolifération.



Régis Domergue, Cirad

Figure 24. Repiquage de SCE.



Régis Domergue, Cirad

Figure 25. Embryons en développement.



Régis Domergue, Cirad

Figure 26. Embryons ayant germé.



Régis Domergue, Cirad

Figure 27. Plantules régénérées.

2. Critères d'évaluation

Des critères communs sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de la technique utilisée et pour faciliter les échanges d'information entre équipes travaillant sur l'embryogenèse somatique du bananier. Ci-dessous, nous proposons quelques indicateurs qualitatifs et quantitatifs relatifs aux étapes principales de l'embryogenèse somatique.

Formation de cals idéaux

Méthode des scalps

% de CI = nombre de CI/nombre de scalps inoculés

Méthode des fleurs immatures

% de CI = nombre de CI/nombre de bourgeons mâles inoculés

La valeur obtenue pour 'Grande naine' est comprise généralement entre 3 et 10% avec la méthode des scalps, et est de 8% en moyenne avec la méthode des fleurs immatures. Les valeurs pour les deux méthodes ne sont cependant pas comparables car ce sont les fleurs immatures dans le bourgeon mâle qui sont inoculées et non pas le bourgeon mâle lui-même.

Etablissement de suspensions cellulaires embryogènes

% de SCE initiées = nombre de SCE/nombre de CI placés en milieu liquide

Ce pourcentage se situe entre 10 et 30% avec 'Grande naine' (Domergue et collaborateurs, résultats non publiés).

Une SCE de bonne qualité est formée d'agrégats cellulaires homogènes. Cette homogénéité est observée après de nombreux mois de culture (généralement 6 à 9 mois). Une SCE peut être caractérisée par l'accroissement mensuel du volume de cellules sédimentées, qui est normalement entre 1,5 et 4. Une fois établie, une SCE peut continuer à se multiplier pendant des mois, voire des années.

Formation d'embryons

Le nombre d'embryons obtenus par volume de cellules étalées est le critère clé qui permet d'évaluer la qualité d'une suspension. Par exemple, 1 ml de cellules sédimentées peuvent générer entre 100 et 300 000 embryons (Grapin *et al.* 1996, Côte *et al.* 1996, Strosse *et al.* sous presse).

Taux de réussite de formation d'embryons = nombre d'embryons/ml de cellules étalées

Potentiel de régénération

Le pourcentage de germination est souvent utilisé pour évaluer le processus de régénération. Il a atteint 80% dans certains laboratoires. Outre des différences au niveau méthodologique, il est probable que la variabilité des résultats reflète également la difficulté à estimer le nombre d'embryons. Nous proposons les critères suivants :

% de germination = nombre de plantules obtenues/nombre d'embryons mis sur un milieu de germination

Une autre façon d'évaluer les résultats du processus de régénération est de calculer la capacité de régénération.

Capacité de régénération = nombre de vitroplants produits/ml de cellules étalées

Avec 'Grande naine', des valeurs de l'ordre de 35 000 plantules/ml de cellules étalées ont été observées (Georget et collaborateurs résultats non publiés, Strosse *et al.* sous presse).

Afin de déterminer la capacité de régénération d'une suspension, un essai quantitatif est nécessaire. La méthode suivante est basée sur le poids et le nombre d'embryons ayant germé et de plantes provenant d'échantillons représentatifs.

- Déterminer le poids total de la suspension cellulaire régénérée, c'est-à-dire le poids des embryons en faisant attention de ne conserver que les embryons.
- Prélever trois échantillons représentatifs de la suspension cellulaire, les peser séparément et compter le nombre d'embryons dans chacun.
- Prélever une autre série de trois échantillons représentatifs, les peser séparément et transférer chaque échantillon dans un tube à essai (*méthode des scalps*) ou une boîte de Pétri de 90 mm (*méthode des fleurs immatures*) contenant un milieu de germination : 12 ml de RD2 (*méthode des scalps*) ou 25 ml de M4 (*méthode des fleurs immatures*).
- Incuber sous conditions standards.
- 1,5 mois après le début de la germination :
 - déterminer le nombre moyen de pousses vertes,
 - transférer les pousses vertes sur un milieu d'enracinement MS (environ 3 ml par plante),
 - incuber sous conditions standards.
- 1,5 à 2 mois après le début de l'enracinement sur milieu MS :
 - déterminer le nombre moyen de vitroplants enracinés.

Ces données sont utilisées pour déterminer le nombre total d'embryons ou de vitroplants enracinés obtenus pour un volume donné de suspension cellulaire. A titre d'exemple, le nombre de plantes régénérées par ml de cellules sédimentées d'une SCE de type Cavendish peut excéder 10 000. Une moyenne de 35 000 plantules enracinées/ml de cellules étalées a déjà été observé dans des expériences à grande échelle (Georget et collaborateurs résultats non publiés).

Une liste des cultivars pour lesquels la méthode des scalps ou celle des fleurs immatures a donné de bons résultats est présentée dans l'annexe 3. Les résultats proviennent des laboratoires où travaillent les auteurs.

3. Les limites de l'embryogenèse somatique

Bien que l'embryogenèse somatique chez le bananier soit une procédure bien établie et que des techniques standards existent, l'initiation d'une SCE n'est toujours pas utilisée de façon routinière (Schoofs *et al.* 1999). Ceci est surtout dû au fait que les tissus de bananier sont très récalcitrants à l'embryogenèse, que le temps nécessaire pour obtenir une suspension cellulaire embryogène est long, et que le risque de variation monoclonale et de contamination sont relativement élevés.

Le principal obstacle à l'utilisation de bananes comestibles (et par conséquent sans graines) est que le cal embryogène doit être initié à partir de tissus différenciés et non pas, comme c'est le cas pour la plupart des monocotylédones, à partir de tissus embryogènes comme des embryons zygotiques. Par conséquent, il faut utiliser des centaines d'explants (fleurs ou scalps) pour obtenir un seul cal embryogène de bonne qualité. De plus, le temps écoulé entre l'inoculation de l'explant sur le milieu d'induction et l'établissement d'une suspension de bonne qualité est relativement long : entre 7 et 14 mois. Avec la méthode des scalps, il faut en plus ajouter le temps de préparation qui peut aller de 3 à 14 mois, selon le cultivar.

Conditions de culture

Une des conséquences importantes de la faible réponse embryogène du bananier est que l'optimisation du milieu de culture nécessite un dispositif expérimental élaboré et beaucoup de main-d'œuvre. Ceci est probablement la principale raison pour laquelle les milieux de culture ZZ et MA1 utilisés pour induire l'embryogenèse somatique, n'ont pas été modifiés en 10 ans malgré le besoin de milieux plus performants pour certains cultivars.

Voici quelques suggestions présentant des façons de procéder pour optimiser l'embryogenèse somatique chez le bananier.

- Optimiser le matériel de départ (taille, état osmotique...).
- Changer les conditions osmotiques du milieu de culture.
- Changer la concentration des auxines responsables de la croissance désorganisée des cellules embryogènes.
- Ajouter des composés qui induisent l'embryogenèse, comme des acides aminés ou des polyamines.
- Changer les conditions physiologiques (pH, température...).
- Utiliser des cultures nourricières.
- Mettre au point une procédure pour obtenir des cals embryogènes basée sur l'utilisation successive de deux milieux de cultures (choc auxinique).

L'embryogenèse somatique, comme la plupart des techniques *in vitro*, est un domaine qui progresse au gré des résultats expérimentaux. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans des domaines de recherche fondamentaux pourra peut-être contribuer à raffiner cette méthodologie.

Variation somaclonale

Peu d'études ont été publiées sur la prévalence de variants parmi les plants de bananiers produits par embryogenèse somatique. Chez 'Grande naine', il a été observé que certains des plants dérivés de suspensions cellulaires embryogènes de 4 mois étaient conformes et avaient des caractéristiques agronomiques comparables à celles de vitroplants (Côte *et al.* 2000a). Des résultats semblables ont été obtenus avec des plants 'IRFA 903' dérivés de suspensions cellulaires de 7 mois (Côte *et al.* 2000b). Ces données suggèrent que l'embryogenèse somatique peut être utilisée pour modifier génétiquement des plantes étant donné qu'une certaine proportion de variants peut être tolérée pour cet usage.

Toutefois, on ne peut pas encore dire si la technique de l'embryogenèse somatique pourra être utilisée pour multiplier en masse les bananiers. Les résultats disponibles ont été obtenus avec des suspensions relativement jeunes (4 à 7 mois). Or, étant donné qu'aujourd'hui, seule une faible quantité de plantes est régénérée à partir de telles suspensions, cette technique ne peut toujours pas être utilisée pour la production à grande échelle. De plus, des résultats non publiés indiquent que la variation somaclonale augmente avec l'accroissement du temps de culture. Des proportions de variants somaclonaux allant de 15 à 100% ont été observés chez 'Grande naine' après 15 mois de culture (Côte et collaborateurs résultats non publiés).

De nombreuses équipes sont à la recherche de marqueurs moléculaires de la variation somaclonale. De tels marqueurs aideraient à comprendre comment la variation somaclonale est générée et à identifier les facteurs qui influencent son développement. Des données, utilisant la cytométrie en flux, aideraient également à mieux comprendre comment les techniques d'embryogenèse somatique génèrent des variants (Roux *et al.* sous presse).

La question de la variation somaclonale se pose également pour la cryoconservation, utilisée pour conserver les suspensions cellulaires embryogènes. La conformité des plantes produites à partir de suspensions cellulaires embryogènes cryoconservées a été étudiée par Côte *et al.* (2000b). Ces derniers n'ont observé aucune différence entre les performances agronomiques de plantes régénérées à partir de SCE cryoconservées et de plantes témoin. Une SCE cryoconservée doit également préserver ses caractéristiques (comme sa capacité à être utilisée pour la modification génétique). Récemment, des niveaux comparables d'expression transitoire et stable ont été observés chez des bananiers produits à partir de SCE qui avaient été cryoconservées et de SCE qui ne l'avaient pas été (Panis *et al.* sous presse).

Références

- Côte F.X., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson & J.V. Escalant. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiologia Plantarum* 97:285-290.
- Côte F.X., M. Folliot, R. Domergue & C. Dubois. 2000a. Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grande naine). *Euphytica* 112:245-251.
- Côte F.X., O. Goue, R. Domergue, B. Panis & C. Jenny. 2000b. In-field behavior of banana plants (*Musa* spp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *Cryo-letters* 21:19-24.
- Cronauer S.S. & A.D. Krikorian. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Rep* 7:23-25.
- Dhed'a D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke & E. De Langhe. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
- Dhed'a D. 1992. Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et régénération en plantes par embryogénèse somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.). PhD thesis, KULeuven, Belgium. 171pp.
- Diekmann M. & C.A.J. Putter. 1996. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm. No.15. *Musa*. 2nd edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 29pp.
- Escalant J.V. & C. Teisson. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Rep* 7:181-186.
- Escalant J.V., C. Teisson & F.X. Côte. 1994. Amplified Somatic Embryogenesis from male flowers of triploid Banana and plantain cultivars (*Musa* sp). *In Vitro Cell Biol Devpmt.* 30:181-186.
- Escalant J.V., M. Dufour & B. Rabot. 1996. Plant genetic engineering in CATIE. Unidad de biotecnología. CATIE. Informe bianual 1994-1995. 2pp.
- Georget R., R. Domergue, N. Ferrière & F.X. Côte. 2000. Morpho-histological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Report* 19:748-754.
- Grapin A., J. Schwendiman & C. Teisson. 1996. Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* 32:66-71
- Grapin A., J.L. Ortíz, T. Lescot, N. Ferrière & F.X. Côte. 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain (*Musa* AAB). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61:237-244.
- Grapin A., J.L. Ortiz, R. Domergue, J. Babeau, S. Monmarson, J.V. Escalant, C. Teisson & F.X. Côte. 1998. Obtention de cals embryogènes, et initiation et régénération de suspensions cellulaires embryogènes à partir de fleurs immatures mâles et femelles de *Musa*. *INFOMUSA* 7(1):13-15.
- Hamill S.D., S.L. Sharrock & M.K. Smith. 1993. Comparison of decontamination methods used in the initiation of banana tissue cultures from field-collected suckers. *Plant Cell and Organ Culture* 33:343-346.
- INIBAP. 2000. Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 1999. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.

- Ma S.S. 1991 Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. Pp. 181-188 *In* Proceedings of Symposium on Tissue culture of horticultural crops, Taipei, Taiwan, 8-9 March 1988.
- Morel G. & R.H. Wetmore. 1951. Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany* 38:138-140.
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Novak F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Confer & T. Xiolang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology* 46:125-135.
- Panis B. & N.T. Thinh. 2001. Cryoconservation de matériel génétique de bananier. Guide Technique INIBAP 5 (J.V. Escalant et S. Sharrock, eds). Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Montpellier, France. 44pp.
- Panis B., H. Strosse, S. Remy, L. Sági & R. Swennen. *In press*. Cryopreservation of banana tissues: support for germplasm conservation and banana improvement. *Banana Improvement: Cellular and Molecular Biology, and Induced Mutations*.
- Roux N., H. Strosse, A. Toloza, B. Panis & J. Dolezel. *In press*. Detecting ploidy level instability of banana embryogenic cell suspension cultures by flow cytometry. *Banana Improvement: Cellular and Molecular Biology, and Induced Mutations*.
- Schenk R.U. & A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous Plant Cell Cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. PhD thesis, KULeuven, Belgium. 257pp.
- Schoofs H., B. Panis, H. Strosse, A. Mayo Mosqueda, J. Lopez Torres, N. Roux, J. Dolezel & R. Swennen. 1999. Difficultés rencontrées pour établir et maintenir des suspensions cellulaires morphogènes de bananier et pour régénérer des plants par embryogenèse somatique. *INFOMUSA* 8(2):3-7.
- Strosse H., I. Van den Houwe & B. Panis. *In press*. Banana cell and tissue culture - review. *Banana Improvement: Cellular and Molecular Biology, and Induced Mutations*.
- Van den Houwe I., J. Guns & R. Swennen. 1998. Bacterial contamination in *Musa* shoot tip cultures. *Acta Horticulturae* 490:485-492.
-

Annexe 1. Acronymes

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

AIA : acide indole acétique

BA, BAP : 6-benzylaminopurine

CC : cal compact

CE : cal embryogène portant seulement quelques embryons

CI : cal idéal convenant à l'initiation d'une SCE

FDA : diacétate de fluorescéine

HR : humidité relative

MA1 : milieu d'induction de cal embryogène pour la méthode des fleurs immatures

MA2 : milieu de culture des suspensions cellulaires

MA3 : milieu de développement des embryons

MA4 : milieu de germination des embryons

P6 : milieu MS additionné de 1 μM AIA et de 1 μM BAP

P5 : milieu MS additionné de 1 μM AIA et de 10 μM BAP

P4 : milieu MS additionné de 1 μM AIA et de 100 μM BAP

RD1 : ZZss additionné de 100 $\mu\text{g/L}$ myo-inositol et dépourvu de régulateurs de croissance des plantes

RD2 : RD1 additionné de 1 μM BAP

SCE : suspension cellulaire embryogène

VCC : volume cellulaire compacté

VCS : volume cellulaire sédimenté

ZZI : milieu liquide MS dilué de moitié additionné de 5 μM 2,4-D et 1 μM zéatine

ZZss : ZZI solidifié avec 3 g/L de Gelrite

Annexe 2. Milieux de culture

Tableau 1. Composition des milieux de culture utilisés dans l'embryogenèse somatique de *Musa* spp. (méthode des scalps)

	P6	P5	P4	ZZss	ZZI	RD1	RD2
Macro-éléments	MS	MS	MS	½ MS	½ MS	½ MS	½ MS
Micro-éléments	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Vitamines	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Acide ascorbique (mg/L)	10	10	10	10	10	10	10
Myo-inositol (mg/L)						100	100
AIA (mg/L)	0,175	0,175	0,175				
BAP (mg/L)	0,227	2,273	22,73				0,227
2,4-D (mg/L)				1	1		
Zéatine (mg/L)				0,219	0,219		
Saccharose (g/L)	30	30	30	30	30	30	30
Agent gélifiant (Gelrite) (g/L)	3	3	3	3		3	3
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Tableau 2. Composition des milieux de culture MA (en référence aux travaux du professeur Ma) utilisés dans l'embryogenèse somatique de *Musa* spp. (méthode des fleurs immatures)

	MA1 Callogénèse	MA2 Multiplication	MA3 Régénération	MA4 Germination
Macro-éléments	MS	MS	SH	MS
Micro-éléments (sauf le fer)	MS	MS	SH	MS
FeEDTA	+	+	+	+
Vitamines*	MA	MA	MA	Morel
AIA (mg/L)	1			2
2,4-D (mg/L)	4	1		
ANA (mg/L)	1		0,2	
Zéatine (mg/L)**			0,05	
2iP (mg/L)			0,2	
Kinétine (mg/L)			0,1	
BAP (mg/L)				0,5
Saccharose (mg/L)	30	45	45	30
Lactose (g/L)			10	
Acides aminés (mg/L)	Glutamine 100 g/L	Glutamine 100 g/L	Glutamine 100 g/L Proline 230 g/L	
Extrait de malte (mg/L)	100	100	100	
Agente gélifiant (g/L)	Agar Tipo II 7 g/L		Phygel 4 g/L	Phygel 3 g/L
pH	5,7	5,3	5,8	5,8

* Voir tableaux 3 et 4.

** Filtrer (0,2 µm), mettre à l'autoclave et ajouter lorsque la température de médium est descendue à 50°C.

Tableau 3. Composition des vitamines de Ma (Ma 1991)

	Concentration (mg/L)
Biotine	1
Glycine	2
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	0,5
Chlorure de pyridoxine	0,5
Chlorure de thiamine	0,1

Tableau 4. Composition des vitamines de Morel (Morel et Wetmore 1951)

	Concentration (mg/L)
Biotine	0,01
Calcium panthotenate	1
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	1
Chlorure de pyridoxine	1
Chlorure de thiamine	1

Annexe 3. Liste des cultivars ayant donné des cals embryogènes ou des suspensions cellulaires embryogènes

Tableau 5. Cultivars ayant donné des cals embryogènes (CI) ou des suspensions cellulaires embryogènes (SCE) en utilisant la méthode des fleurs immatures

Cultivar	Groupe génétique	CI	SCE	Référence
Col. 49	AA	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1998
SF 265	AA	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1998
IRFA 903	AA	X	X	Côte <i>et al.</i> 2000b
Grande naine	AAA	X	X	Escalant <i>et al.</i> 1996, Côte <i>et al.</i> 1996
Gros Michel	AAA	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1998
Yangambi km 5	AAA	X	Non examiné	Grapin <i>et al.</i> 1998
French sombre	AAB	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1996
Dominico	AAB	X	X	Grapin <i>et al.</i> 1998
Mysore	AAB	X	Non examiné	Grapin <i>et al.</i> 1998
Silk	AAB	X	Non examiné	Grapin <i>et al.</i> 1998
Curare	AAB	X*	X	Grapin <i>et al.</i> 2000
Curare enano	AAB	X*	X	Grapin <i>et al.</i> 2000
FHIA-01	AAAB	X		Grapin <i>et al.</i> 1998
FHIA-02	AAAB	X		Grapin <i>et al.</i> 1998

* Fleur femelle.

Tableau 6. Cultivars ayant donné des cals embryogènes (CE/CI) ou des suspensions cellulaires embryogènes (SCE) en utilisant la méthode des scalps

Cultivar	Groupe génétique	CE	CI	SCE	Référence
Calcutta 4	AA	X			Non publié
Kamaramasenge	AB	X	X	X	Schoofs 1997
Kisubi	AB	X			Schoofs 1997
<i>Musa balbisiana</i> 'tani'	BB	X			Schoofs 1997
Grande naine	AAA	X	X	X	Schoofs 1997, Strosse <i>et al.</i> sous presse
Highgate	AAA	X			Schoofs 1997
Williams	AAA	X	X	X	Schoofs 1997, Strosse <i>et al.</i> sous presse
Igitsiri	AAAh	X			Schoofs 1997
Agbagba	AAB	X		X	Strosse <i>et al.</i> sous presse
Bise egome	AAB	X	X	X	Schoofs 1997
Lady finger	AAB	X			Schoofs 1997
Prata	AAB	X			Schoofs 1997
Orishele	AAB	X	X	X	Strosse <i>et al.</i> sous presse
Three hand planty	AAB	X	X	X	Schoofs 1997
Bluggoe	ABB	X	X	X	Dhed'a 1991
Cardaba	ABB	X			Dhed'a 1992
Saba	ABB	X		X	Dhed'a 1992
Obino l'ewai	AAB	X		X	INIBAP 2000

