

# ESSAI D'ASSAINISSEMENT DES PLANTS VIROSES PAR BBTV DES BANANIERS PLANTAINS LITETE ET LIBANGA LIKALE (MUSA AAB) PAR LA CULTURE IN VITRO

**Bola Mandonge Alice<sup>1\*</sup>, Iungbi Singa Nathan<sup>2</sup>**

<sup>1\*</sup>Assistante2 à l'ISP/Lubutu et Université Libre de Kisangani, chercheur dans le domaine de Biotechnologie et de l'Environnement

<sup>2</sup>Chef de travaux à l'ISP/Lubutu et à l'Université libre de Kisangani, responsable de la cellule eau et cellule Informatique de l'Université libre de Kisangani. Chercheur dans les domaines de la chimie analytique et environnementale (chimie des eaux et des plantes médicinales), gestion informatique, sante environnementale et statistiques

**\*Corresponding Author:**

---

## Summary

*This study focused on testing of sanitation of plant virus diseases of banana by BBTV by culture in vitro in Kisangani. Cultivation on a medium containing IAA 10 $\mu$ M and 100  $\mu$ M BAP and the enzyme immuno heap ELISA test was conducted in this work using cultivars Litete and Libanga Vikram on the symptoms of the disease of BBTD. To do this, 40echantillon are analyzed to confirm the presence or absence of BBTV referring on level 4 and 5 BBTD rating scale.*

*HEAP ELISA results revealed the presence of the virus 100% of samples tested. Cultivation allowed obtaining an average of 31.7 buds meristematic cultivar Libanga Vikram and 33.1 to Litete buds.*

*The enzyme immuno pile applied ELISA test after Asim cultivation of plant virus diseases of banana by BBTV showed after analysis that, 75% of the samples of Litete have proved free of the virus while 25% were positive while 33.3% remained positive for the cultivar Libanga Vikram with 66.7% of remediated samples.*

*At the end of this work, in the light of the results obtained, it appears that micro-propagation is one of the techniques of culture in vitro that allows rapid and mass of healthy seedlings for this virus with a remediation rate relatively high in the studied cultivars.*

## Resume

*Cette étude a porté sur l'essai d'assainissement de plants virosés de bananiers par BBTV par la culture in vitro à Kisangani.*

*La mise en culture sur un milieu contenant 10 $\mu$ M de AIA et 100 $\mu$ M de BAP et le test immuno enzymatique TAS ELISA ont été réalisés dans ce travail en utilisant les cultivars Litete et Libanga Likale portant les symptômes de la maladie de BBTD. Pour ce faire, 40 échantillons ont été analysés pour confirmer la présence ou l'absence de BBTV en se référant sur l'échelle de cotation du BBTD du niveau 4 à 5.*

*Les résultats obtenus par TAS ELISA ont révélé la présence du virus dans 100% d'échantillons testés. La mise en culture a permis l'obtention d'une moyenne de 31,7 bourgeons méristématique pour le cultivar Libanga Likale et de 33,1 pour celui de Litete.*

*Le test immuno enzymatique TAS ELISA appliqué après la mise en culture de plants virosés de bananier par BBTV a montré après analyse que, 75% des échantillons de Litete se sont révélés indemnes du virus tandis que le 25% se sont révélés positifs pendant que 33,3% sont restés positifs pour le cultivar Libanga likale avec 66,7% d'échantillons assainis. Au terme de ce travail, à la lumière des résultats obtenus, il ressort que la micro propagation est l'une des techniques de la culture in vitro qui permet l'obtention rapide et en masse de plantules saines pour ce virus avec un taux d'assainissement relativement élevé chez les cultivars étudiés.*

## INTRODUCTION

Le bananier constitue l'une des cultures les plus importantes dont la production se réalise dans les régions tropicales consommée à l'échelle planétaire. Cette culture présente de multiples intérêts : économiques, médical ; agronomique et nutritionnel. Il s'agit donc d'une culture importante à cause de sa saveur, son arôme et des potentialités énergétiques que renferment ses fruits.

Par sa multiplication exclusivement végétative, sa production est facile à assurer tant sur le terrain que surtout au laboratoire. Cependant, aujourd'hui cette plante herbacée géante est menacée par diverses attaques parasitaires, des maladies et changement climatique. Ces contraintes ont un effet dramatique sur la production de cette culture. Elles affectent négativement la production des bananes à telle enseigne que du fait de leur faible rendement, les bananes deviennent inaccessibles aux ménages pauvres.

Les maladies virales constituent l'une des causes de la réduction drastique de la production du bananier. Ce sont des infections généralisées affectant toute la plante à l'exception du méristème. Incurables au champ, le seul traitement approprié est essentiellement mécanique consistant à l'élimination de tous les pieds malades. Parmi ces infections virales, la plus dévastatrice reste le « Banana Bunchy top virus » (BBTV) qui constitue son inexorable expansion dans le monde tropical. Cette maladie représente une contrainte majeure pour les producteurs des plantains dans toute la zone de leur répartition en générale et en RDC en particulier. Ce dernier pays a dû subir, à la suite de cette infection virale, une chute spectaculaire de sa production annuelle passant de 2.400.000 tonnes il y a de cela 15 ans à 699.015 tonnes de nos jours ([www.fao.org/.../fr/](http://www.fao.org/.../fr/)).

En réponse à ce problème ; l'assainissement des pieds de plantains infectés par la culture in vitro des tissus est considérée, d'après des nombreuses recherches scientifiques, comme étant l'un des moyens efficaces qui s'oppose à la fois pour éradiquer la pression parasitaire en rendant les plantes plus résistantes, mais aussi pour répondre aux besoins des producteurs et consommateurs.

Cette technique d'améliorations génétique in vitro, caractérisée par la totipotence, permet l'obtention à partir d'une plante atteinte de BBTV une plante saine éliminant par conséquent le risque d'une perte importante de la production.

Ce travail postule que l'utilisation des techniques de culture in vitro permet d'assainir les plants des bananiers virosés par le BBTV. Il vise spécifiquement à :

- Détecter les bananiers plantains atteints de la maladie du BBTV suivant les niveaux de l'échelle variant de 1 à 5 ;
- Confirmer la présence du virus grâce au test TAS ELISA ;
- Assainir à l'aide de la micro propagation les plantes reconnues positives et confirmer leur séronégativité.

## 2. MATERIEL ET METHODE

L'essai d'assainissement des plants virosés par le BBTV par l'utilisation de la micro propagation in vitro constitue avant tout une expérimentation scientifique exigeant de rigoureuses conditions d'asepsie. Il requiert, de ce fait, un matériel technique adéquat pour sa réalisation. Ainsi, ce travail a été réalisé au laboratoire d'amélioration des tissus et micro propagation de la faculté des sciences de l'université de Kisangani. Ce laboratoire a bénéficié d'une subvention financière en vue de sa réhabilitation par BIODIVERSITY INTERNATIONAL en 2007.

Par la réalisation de ce travail les matériels végétaux proviennent des deux cultivars récoltés dans les environs de la ville de Kisangani : les cultivars du type faux corne ( Libanga Likale) et du type french (Litete).

Ensuite, nous avons procédé à la culture au laboratoire des explants prélevés sur le très jeune sujet, le milieu devant répondre le mieux à la culture des tissus. L'enrichissement de ce milieu en sels minéraux de MURASHIGE et SKOOG (1962) a été fait. D'autre constituant notamment 30g/l de saccharose, l'Agar Agar (5g/l) ou gélrîte (2g/l), l'acide nicotique (0,5mg), pyrodoxine (0,4mg/l), thianine (0,5mg) et 2mg/l de glycine.

Les solutions nutritives sont constituées des éléments minéraux additionnés de divers régulateurs de croissance utilisés pour la réalisation de croissance (les gibbérélines, l'acide abscissique, l'éthylène, les cytokinines et l'auxine).

Les régulateurs de croissance utilisés pour la réalisation de cette expérience sont les auxines et les cytokinines.

La mise en culture au laboratoire, dans des conditions aseptiques bien contrôlées à l'abri de toute contamination des explants prélevés sur de très jeunes sujets se fait suivant la méthode décrite par BANTER JEE et LANGHE (1985),

BANTER JEE et al. (1985) Et VUYL STEKE (1989). Cette technique comprend différentes étapes suivantes :

- Se rassurer que les rejetons gardent leur aptitude de multiplication.
- Elimination de tous les tissus non méristématique (DHED'A ...2011).
- Prélèvement au cœur du bulbe
- Extraction de l'apex
- Le reste du processus se déroule dans une atmosphère stérile et de haute aseptie :

- a. La désinfection en quatre étapes : lavage soigneux de l'échantillon à l'eau courante
- b. L'échantillon est plongé dans l'éthanol à 70% durant 15 secondes
- c. Stérilisation du matériel végétal dans la solution d'hyper chlorite de sodium à 30% dans l'eau de javel à 80 % pendant 20 minutes.
- d. Rinçage de l'échantillon dans l'eau distillée stérile à 3 reprises.
- ✓ Couverture et stérilisation à l'autoclave des milieux de cultures
- ✓ Obtention du matériel végétal à cultiver in vitro
- ✓ Placement de l'échantillon dans un tube à essai contenant le milieu de culture
- ✓ Phase d'initiation et d'organisation de bourgeons dans une enceinte à lumière continue et à température ambiante du laboratoire
- ✓ Après le temps d'incubation les bourgeons obtenus subissent divers traitement toujours en condition stérile afin de provoquer leur enracinement

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Etats sérologique des différents cultivars avant la mise en culture

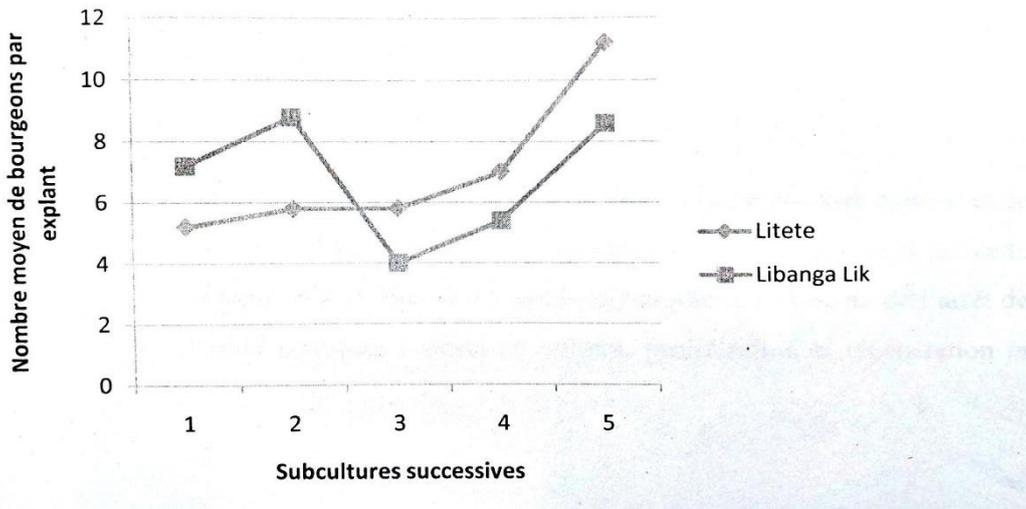
Il est important de s'assurer de l'état sérologique avant de procéder à l'assainissement des cultivars recueillis. L'objectif visé par ce test est de confirmer la présence ou non du virus de BBTV dans les échantillons isolés. Les données relatives à cette opération sont reprises au tableau 1.

**Tableau 1 :** Etat sérologique de différents cultivars

CULTIVARS	GENOTYPE	NIVEAU DE SYMPTOME SUR L'ECHELLE DE COTATION DE (1 à 5)	POIDS	RESULTATS ELISA
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	4	0,13	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	4	0,24	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	5	0,12	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	4	0,22	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	5	0,2	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	5	0,15	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	5	0,17	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	5	0,13	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	5	0,16	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	5	0,23	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	5	0,22	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	4	0,16	+
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	4	0,12	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,24	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,13	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,24	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,12	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,22	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,2	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,15	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,17	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,13	+
LITETE	FRENCH AAB	4	0,16	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,23	+
LITETE	FRENCH AAB	4	0,22	+
LITETE	FRENCH AAB	4	0,16	+
LITETE	FRENCH AAB	4	0,24	+
LITETE	FRENCH AAB	5	0,2	+

La lecture du tableau 1 fait nettement ressortir que le niveau de symptôme sur l'échelle de cotation employé varie de 4 à 5. Les plants testés avant la mise en culture se sont révélés positifs avec un taux de 100.% Il n'existe pas de différences en fonction de cultivar : tous les deux cultivars sont porteurs de virus BBTV.

Le poids de cultivars analysés ne montre pas de fortes différences. Enfin, il ne semble pas exister de liens entre le poids et le...de symptôme observé.



**Figure 1 :** Evolution comparative des nombres de bourgeons proliférés au cours de 5 subculture successif.

Le taux de prévalence particulièrement élevé de la maladie BBTD a été constaté par Wandja (2011) après analyse de 14 cultivars de jardin .de case dans la ville de Kisangani. Des résultats similaire ont été obtenus par DHED'A (2011).

### 3.2. Initiation

Il s'agit de la première mise en culture in vitro dans le milieu approprié de l'apex caulinaire. Initiation permet le passage progressif de l'apex, de la coloration plus au moins blanchâtre à la couleur verte traduisant le début de la photosynthèse. Après cette transformation de la coloration de l'apex, celui-ci subira une excision lors de la seconde phase d'initiation puis il sera par la suite fendu en deux pour stimuler la croissance.

**Tableau 2 :** Résultats de la première initiation

CULTIVARS	GENOTYPES	NOMBRE D'EXPLANT	NOMRE D'INFECTION	POURCENTAGE D'INFECTION
LIBANGA LIKALE	FAUX CORNE AAB	20	6	30
LITETE	FRENCH AAB	20	5	25
TOTAL	2CULTIVARS	40	11	27,5

Les résultats du tableau 2, relatifs à la première phase d'initiation, montrant un haut niveau d'infection chez le cultivar LIBANGA LIKALE avec un taux de 30%, par rapport au cultivar LITETE (25% d'infecté). Sur le 100% d'apex caulinaire initiés, il ressort que taux de réussite atteint 72,5% pour de technique de manipulation au cours de la mise en culture ainsi que respect rigoureux de différentes conditions d'asepsie requises.

### 3.3. Nombre des bourgeons prolifères au cours de différentes subcultures

Après trois semaines d'initiation sur le milieu riche en hormones de croissance, tous les explants isolés dans le strict respect des conditions aseptiques produisent de bourgeons. Cinq subculture ont été réalisés et les résultats sont synthétisés à la figure 1

Les résultats de la figure indiquent dans l'ensemble une augmentation du nombre de bourgeons du cultivar LITETE au cours de 5 subcultures avec une production de 5,2 bourgeons au départ à 11,2 bourgeons à la fin de l'expérimentation. Par contre, l'évolution de la production des bourgeons de troisième subculture passant de 7,2 à la première subculture à une moyenne de 4 à la troisième subculture. Cette diminution considérable peut être justifiée par la présence de composé interrompt souvent le développement de l'apex caulinaire lors de sa mise en culture au cours de différents traitement (MATEILLE et Al.). L'apparition de cette substance noirâtre constitue un facteur limitant de la croissance des bourgeons. Ceci est dû au fait que le bananier contient de façon naturelle beaucoup de substances phénoliques et dès que l'un de ses tissus est blessé, par exemple par l'attaque parasitaire, la sécrétion de ces composés agit comme moyen de défense qu'utilise cette plante. Ces composés forment pendant la culture, dans les alentours de la région présumptive des bourgeons latéraux empêchant ainsi l'expression correcte de l'échantillon pendant son incubation (ADHEKA, 2007).

Le noircissement du milieu dû à ces composés est aussi souvent synonyme de l'épuisement des éléments nutritifs nécessaire pour la croissance de la plante in vitro et demande le transfert de l'explant dans un milieu neuf bien avant même son expression complète. C'est pourquoi plusieurs repiquages ont été nécessaires au cours de cette expérimentation. A cet effet, l'utilisation de l'acide ascorbique s'avère très utile pour contrecarrer l'effet des composés phénoliques en empêchant le noircissement de milieux par oxydation des substances phénoliques excrétées par les explants mais de la comparaison des résultats, il ne ressort aucune différence significative entre les deux cultivars sur le plan statistique.

La moyenne totale de bourgeons produits durant cette étude en utilisant les rejets du sujet atteint de BBTV est de 31,7 bourgeons chez le cultivar Libanga Likale et de 33,1 chez Litete. La comparaison de la moyenne de bourgeons obtenus par tube de deux cultivars étudiés montre qu'il existe une différence significative entre les répétitions au cours de différentes subcultures tandis qu'en appliquant le test statistique T de Student on remarque aucune différence significative imputables au traitement.

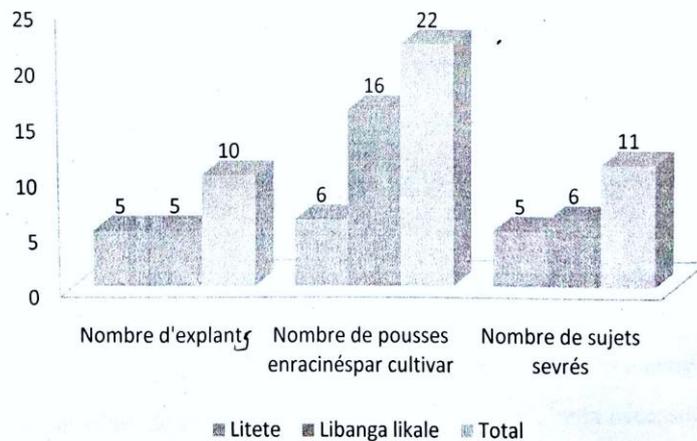
Les études antérieures révèlent que le taux moyen de prolifération en utilisant un milieu de prolifération contenant 10µM de BAP peut varier entre 1,4 et 21,4. Cette moyenne peut augmenter considérablement jusqu'à 30 sur un milieu dix fois plus enrichi en BAP comme celui utilisé dans ce travail (DHED'A, 1992).

Les résultats obtenus dans ce travail approchent donc ceux des autres travaux réalisés dans la même perspective (DECHUVI, 2004 ; ADHEKA, 2007).

**3.5. Enracinement de cultivars in vitro**

L'apparition des racines est synonyme de passage de bourgeon en rejet ou à la plante entière. Ce passage se fait grâce au respect de l'équilibre de concentration des régulateurs de croissances utilisés au cours de la mise en culture.

La figure 2 présente les résultats de la rhizogenèse.



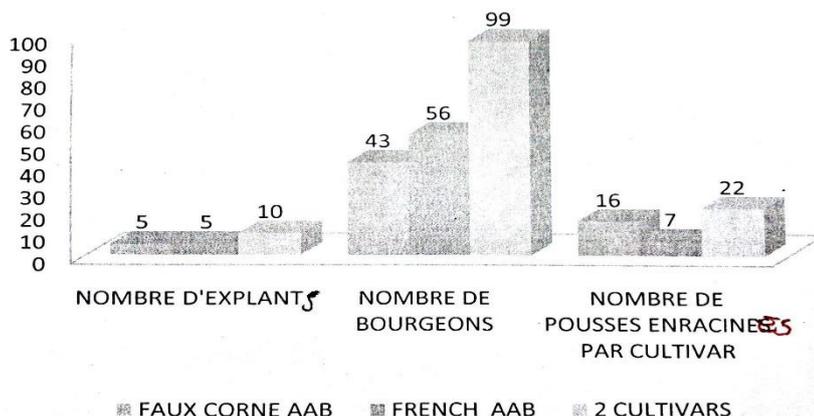
**Figure 2 :** Enracinement des pousses in vitro

La figure 2 montre un taux élevé des pousses enracinées chez le cultivar Libanga likale avec un effectif de 16 plants tandis que le cultivar Litete a présenté un effectif moins élevé de 6 plants

Les résultats obtenus par ce travail attestent la nécessité de l'utilisation de différentes techniques in vitro grâce aux nouvelles techniques qu'elle a fait apparaître dans le domaine de la multiplication végétative. D'où il devient indispensable de maîtriser les conditions de la rhizogenèse (KAUSA, 1979).

**3.6. Nombre des sujets sevrés chez les deux cultivars étudiés**

La figure 3 fournit des indications sur le nombre de sujets sevrés



**Figure 3 :** Nombre de sujets sevrés

Il ressort de la figure 3 que le nombre de sujets sevrés est de 6 pour le premier cultivar et de 5 pour le second. Ce nombre atteste que tous les bourgeons obtenus au cours de cette expérience n'étaient pas encore développés en plantules au moment de l'arrêt de ce travail.

Une dernière étape de la recherche a été exécutée, celle de la détermination de l'état sérologique de différents cultivars soumis à l'assainissement.

**Tableau 3.** résultats obtenus

Cultivars	Nombre de cultivars testés	Nombre de cultivars positifs	Nombre de cultivars négatifs	% Négatifs
Litete	4	1	3	75
Libanga likale	6	2	4	66,6
Total	10	3	7	70

Le tableau 3 montre qu'après la culture in vitro (prolifération des bourgeons méristématiques et régénération) de plants virosés de bananiers par BBTV, sur le 100% d'échantillons analysés, 75% du cultivar Litete se sont révélés indemnes du virus. Par contre, les 33,3% du cultivar Libanga likale ont montré la persistance du virus en étant toujours positifs au TAS ELISA.

Cette technique mise au point au point en 1952 par MOREL et MARTIN a été employée par WANG et HU en 1980 par l'élimination de plus de 70 viroses connues chez plus de 40 espèces différentes (DHED'A, 2011).

### CONCLUSION ETSUGGESTION

L'essai d'assainissement de plants virosés de bananier par BBTV par la culture in vitro qui a constitué le thème de ce travail vise l'assainissement des plants de bananier virosés par BBTV. Cette étude a concerné deux cultivars de bananiers plantains : Libanga likale et Litete. La mise en culture sur un milieu contenant 10 $\mu$ M de AIA et 100 $\mu$ M de BAP et le test immuno enzymatique TAS ELISA ont été réalisés dans ce travail en utilisant les cultivars Litete et Libanga likale portant les symptômes de la maladie de BBTD. Pour ce faire, 40 échantillons ont été analysés pour confirmer la présence ou l'absence de BBTV en se référant sur l'échelle de notation du BBTD des niveaux 4 et 5.

Les résultats obtenus après la mise en culture et l'analyse au laboratoire révèlent que :

- Les résultats obtenus par TAS ELISA ont révélé la présence du virus dans 100% d'échantillons testés
- La mise en culture a permis l'obtention d'une moyenne de 31,7 bourgeons méristématiques pour le cultivar Libanga likale et de 33,1 pour celui de Litete.
- Le test immuno enzymatique TAS ELISA appliqué après la mise en culture de plants virosés de bananier par BBTV, leur prolifération, régénération et sevrage sous screen house a montré que, 75% des échantillons de Litete se sont révélés indemnes du virus tandis que le 25% se sont révélés positifs pendant que 33,3% sont restés positifs pour le cultivar Libanga likale avec 66,7% d'échantillons assainis.

A la lumière de l'ensemble des résultats de ce travail, nous pouvons conclure que la micro propagation est l'une des techniques de la culture in vitro qui permet l'obtention rapide et en masse de plantules saines ainsi que l'élimination du virus avec un taux relativement élevé chez les cultivars étudiés.

De ce qui précède, nous suggérons d'autres études sur l'assainissement par la culture in vitro soient effectuées plus quantitativement et soient élargies sur toutes les autres nouvelles variétés de bananiers et sur d'autres plantes alimentaires à multiplication végétatives consommées à Kisangani et ses alentours.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1].AENDO I., 2005 : *Etude de Bunchy de Bananier et des attaques de Conmopolites sordidus sur l'axe Yangambi de Lindi PK 15 – PK 25*, mémoire inédit, IFA-Yangambi, 34p
- [2].ADHEKA, 2007 : *Etude de l'effet de la microdécapitation sur la prolifération in vitro des bourgeons chez les trois cultivars de bananiers plantains à Kisangani*, mémoire inédit, FS, UNIKIS, 69p
- [3].BOKANA B., 2011 : *Incidence des maladies d'attaques des nouvelles variétés de bananier tétraploïdes à Kisangani « Cas de FHIA03 »*
- [4].CHAMPION, 1963 : *le bananier G-P liaisonneur et Larousse*, Paris, 263p
- [5].DHED'A D, Moango M. et Swennen, 2011 : *La culture des bananiers plantains en RDCongo*. Support didactiques, édition saint paul Afrique, Kinshasa, 85p
- [6].DHED'A D., 1996 : *Initiation de suspension cellulaire embryogénèse à partir d'explant de bourgeons méristématiques en prolifération (Scalps) chez bananiers (musa spp), de morphogénèse*, Rapport de recherche, laboratoire de morphogénèse végétale expérimentale, Université de Paris sud XI, 84p
- [7].DHED'A D., 1992 : *Culture de suspensions cellulaires et régénération en plantules par embryogénèse somatique chez les bananiers et bananiers plantains (musa sp)*, Thèse, Uliège, 47 – 58p
- [8].DHED'A D., 1991 : *Plant génération in cell suspension culture of cooking banana*. CV Blugoe (Musa spp, fruits, 46 :125 – 135)