



ETUDE COMPAREE DES ESSAIS DE CULTURE *IN VIVO* ET *IN VITRO* SUR LE NIVEAU D'ERADICATION DU VIRUS BUNCHY TOP CHEZ DEUX CULTIVARS DE BANANIERS ET PLANTAINS (*MUSA SPP L.*) CULTIVES AU BENIN

AGBIDINOUKOUN^{1*} Arnaud, AGBADJE¹ T. A. E. Eustache,
ZANDJANAKOU TACHIN² Martine, TOHOUN TODEDI¹ C. Jean-
Marie, AHANHANZO^{1,3} Corneille

¹Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et d'Amélioration des Plantes (LCBVAP)/ Faculté des Sciences et Techniques/Université d'Abomey-Calavi, 01BP 226, Cotonou, Bénin.

²Ecole Nationale Supérieure des Sciences et Techniques Agronomiques (ENSTA), Université d'Agriculture de Kétou, Bénin,

³Centre Béninois de la Recherche Scientifique et de l'Innovation (CBRSI), Cotonou, Bénin.

*Auteur correspondant : arnaudag2002@yahoo.fr

RESUME

Les bananiers et plantains (*Musa spp.*) sont une culture importante qui contribuent à la sécurité alimentaire au Bénin. Leur culture est confrontée à des maladies virales dont la plus redoutable est le Bunchy Top (BBTD) causée par le Virus du Bunchy Top de Bananier (BBTV) transmis par le puceron de bananier. La propagation de la maladie risque de conduire à la non disponibilité de matériels sains de plantation, débouchant sur la disparition des variétés de bananiers et plantains surtout les moins cultivées. Le présent travail vise à régénérer de matériels sains de plantation de deux cultivars (Sotoumon et Planta) de bananiers et plantains à partir de matériels atteints de la maladie BBTD par les méthodes biotechnologiques modernes. Pour ce faire, des rejets ont été collectés sur des plants de bananiers présentant les symptômes de BBTD dans la commune d'Abomey-Calavi. Après traitement, les bulbes extraits de ces rejets ont été répartis en deux lots. Un premier lot a été semé dans un germeoir disposé sous un tunnel à une température variant entre 40°C et 42°C et le second lot a été semé à température ambiante dans une serre. Après indexation par la technique de Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR), les vivoplants obtenus du premier lot révélés positifs sont utilisés



comme plant-mères à partir desquels les apex et les méristèmes ont été prélevés et cultivés *in vitro* sur le milieu MS additionné de 1mg/l de l'acide naphthalène acétique (ANA) et de benzylaminopurine (BAP) et de 8% d'agar. Enfin, les vitroplants régénérés ont été indexés par la même technique. Les principaux résultats révèlent que la température (40°C à 42°C) et la culture d'apex ne réduisent pas la charge virale du BBTV. Par contre, la réduction des ébauches foliaires de méristème diminue la charge virale au niveau des vitroplants. Les vitroplants ayant révélé une faible charge virale peuvent servir à produire d'autres vitroplants sur plusieurs subcultures afin d'éliminer totalement le virus.

Mots clés : *Musa spp.* ; Banana Bunchy Top Virus ; production de plantules saines, méristème ; culture *in vitro*, Bénin.

ABSTRACT

Les bananiers et plantains (*Musa spp.*) sont une culture importante qui contribuent à la sécurité alimentaire au Bénin. Leur culture est confrontée à des maladies virales dont la plus redoutable est le Bunchy Top (BBTD) causée par le Virus du Bunchy Top de Bananier (BBTV) transmis par le puceron de bananier. La propagation de la maladie risque de conduire à la non disponibilité de matériels sains de plantation, débouchant sur la disparition des variétés de bananiers et plantains surtout les moins cultivées. Le présent travail vise à régénérer de matériels sains de plantation de deux cultivars (Sotoumon et Planta) de bananiers et plantains à partir de matériels atteints de la maladie BBTD par les méthodes biotechnologiques modernes. Pour ce faire, des rejets ont été collectés sur des plants de bananiers présentant les symptômes de BBTD dans la commune d'Abomey-Calavi. Après traitement, les bulbes extraits de ces rejets ont été répartis en deux lots. Un premier lot a été semé dans un germeoir disposé sous un tunnel à une température variant entre 40°C et 42°C et le second lot a été semé à température ambiante dans une serre. Après indexation par la technique de Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR), les vivoplants obtenus du premier lot révélés positifs sont utilisés comme plant-mères à partir desquels les apex et les méristèmes ont été prélevés et cultivés *in vitro* sur le milieu MS additionné de 1mg/l de l'acide naphthalène acétique (ANA) et de benzylaminopurine (BAP) et de 8% d'agar. Enfin, les vitroplants régénérés ont été indexés par la même technique. Les principaux résultats révèlent que la température (40°C à



42°C) et la culture d'apex ne réduisent pas la charge virale du BBTv. Par contre, la réduction des ébauches foliaires de méristème diminue la charge virale au niveau des vitroplants. Les vitroplants ayant révélé une faible charge virale peuvent servir à produire d'autres vitroplants sur plusieurs subcultures afin d'éliminer totalement le virus.

Mots clés : *Musa spp.* ; *Banana Bunchy Top Virus* ; production de plantules saines, méristème ; culture *in vitro*, Bénin.

INTRODUCTION

Parmi les principales cultures vivrières qui contribuent à la sécurité alimentaire en Afrique, les bananes et plantains occupent une place non négligeable (Lassoudiaire, 2007). Quatrième produit alimentaire après le riz, le blé et le maïs, ils représentent une source alimentaire pour plus de 400 millions de personnes dans le monde (Lassoudiaire, 2007). La production totale de bananiers et plantains est estimée à 116,7 millions de tonne sur 5,1 millions d'hectare (FAOSTAT, 2019). Leur contribution à la lutte contre la pauvreté est significative (Nkendar *et al.*, 2003 ; Arias *et al.*, 2003 ; Bangata *et al.*, 2018) car ils participent à la création d'emplois (Mialoundama *et al.*, 2016) et à la diversification des revenus dans les zones rurales (Temple *et al.*, 1997 ; Bangata *et al.*, 2018). En Afrique, plus de 90% des bananes produites sont consommées localement (Swennen *et al.*, 2001). Cependant, de lourdes menaces parasitaires compromettent sa production (Lockhart *et al.*, 2000 ; Helliott *et al.*, 2002).. Ces menaces sont capables d'occasionner l'extinction des variétés (Susan et Baker 2015). Parmi elles, les maladies virales occupent la première place dans la chute exponentielle du rendement de production du bananier puisque aucun traitement phytosanitaire ne promet une éradication virale. La Banana Bunchy Top Disease (BBTD) est la maladie virale la plus importante signalée dans de nombreux pays (Caruana *et al.*, 2004). Elle entraîne une perte de production de bananes en Australie, dans les pays asiatiques et en Afrique (Oben *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 2011). Elle a eu son impact dans les zones de production avec une considérable réduction de superficie emblavée (Kumar *et al.*, 2015). Elle est présente au Bénin depuis 2011 (Lokossou *et al.*, 2012). Elle est causée par le Banana Bunchy Top Virus (BBTV), et peut être transmise d'une plantation infectée à une autre à travers les rejets utilisés directement comme matériel de plantation ou introduits dans les systèmes de multiplication horticole et *in vitro* (Lassois



et al., 2013). Pour son éradication, la destruction des plants infectés et l'utilisation des rejets sains sont les méthodes utilisées. Le fait de détruire les plants infectés aggrave la situation de manque de rejets (Kumar *et al.*, 2015) surtout quant aux cultivars locaux peu cultivés et peu répandus. Ainsi, la biodiversité pourrait s'estomper, lorsque ces cultivars locaux seront attaqués car, il serait difficile de trouver des "plants mères sains" à introduire directement dans les systèmes de multiplication. Le recours aux techniques biotechnologiques de sanitation basées sur des protocoles efficaces, s'avère nécessaire (Pathirana *et al.*, 2013). Celles-ci permettront de sauver les cultivars attaqués. Très tôt, il a été montré par Holmes (1948) que les virus sont inégalement répartis dans la plante (Wang *et al.*, 2008). Le méristème par ses caractéristiques, reste la partie de la plante inattaquable par les virus (Wang *et al.*, 2008). Ainsi, la réussite de sa culture mettrait à l'abri tout problème d'infections virales. Or, sa culture pour cette cause exige son excision à une petite taille que possible (Wang *et al.* 2008). Malheureusement, l'excision des méristèmes est laborieuse au vu de leur petitesse. Certains paramètres tels que la petitesse du méristème chez l'espèce (Yin *et al.*, 2007) et le retranchement des primordia chez l'espèce (Wang et Valkonen, 2007) favoriseraient l'obtention de matériels sains de plantation. En effet, un manipulateur aguerrri utilise 6 à 10 minutes pour le prélèvement d'un méristème qui pourrait être accompagné de quelques tissus infectés (Wang et Valkonen, 2007). La présente étude vise l'assainissement viral de deux cultivars de bananiers et plantains cultivés au Bénin en vue d'une élimination du BBTV. L'objectif de ce travail est de produire de matériels sains de plantation de bananiers et plantains cultivés au Bénin à partir de matériels atteints de la maladie du Bunchy Top. Il s'agit spécifiquement de déterminer l'effet de la température 40°C à 42°C lors de la macropropagation sur l'élimination des symptômes de la maladie du Bunchy Top d'une part et l'effet de la taille des explants sur la régénération *in vitro* des plants sains de bananiers et plantains d'autre part.

I. MATERIEL ET METHODES

1.1 Matériel végétal

Les échantillons utilisés sont constitués de deux cultivars locaux « Planta et Sotoumon » ayant présenté les symptômes de BBTB d'une sévérité de niveaux 4 et 5 (Ngama, 2010) en provenance de la commune d'Abomey-



Calavi. Le Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et d'Amélioration des Plantes (LCBVAP) et le Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Analyse des Génomes (LGMAG) du Département de Génétique et des Biotechnologies ont servi de cadre où les manipulations ont été effectuées.

1.2 Méthodes

1.2.1 *Obtention des vivoplants bananiers et plantains par la technique de PIF*

Les rejets ont été parés et séchés à température ambiante pendant quarante-huit heures (Figure 1a). Les bourgeons apicaux ont été excisés (Figure 1b). Les bulbes ont été désinfectés avec une solution de l'hydroxyde de cuivre (65,6%) 45g/l pendant une heure puis séchés une heure avant l'ensemencement (Figure 1c). Les bulbes à semencer ont été répartis en deux lots, l'un a subi un traitement par la chaleur et l'autre sans chaleur. En effet, les rejets du premier lot ont été mis sous germoir où règne une température de 40°C à 42°C (Figure 1d), les rejets du deuxième lot ont subi le même processus que les rejets du premier lot sauf qu'ils ont été cultivés à l'air libre.



Photo a :
Décorticage



Photo b :
Excision des
bourgeons
apicaux



Photo c :
Désinfection
des bulbes



Photo d :Ensemencement
sous tunelle

Planche 1: Différentes étapes de traitement et d'ensemencement des bulbes de bananiers et plantains



1.2.2 *Ensemencement des explants in vitro*

Les bourgeons apicaux ont été prélevés sur les vivoplants. Ils ont subi une pré désinfection avec l'hypochlorite de sodium à 25% pendant 15 min puis une désinfection proprement dite sous la hotte dans la salle de mise en culture. La désinfection proprement dite a consisté en une immersion des explants dans l'hypochlorite de sodium à 15% additionnée de quelques gouttes de Tween 20 pendant 15min suivi de trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile. Après la désinfection, deux lots d'explants en fonction de la taille ont été prélevés à l'aide d'une loupe binoculaire. Les uns de 0,2 cm (figure 2a) pour la culture de méristème et les autres de 1,5 cm (figure 2b) pour la culture d'apex. La mise en culture a été faite sur le milieu de culture de Murashige et Skoog additionné de 1mg/L d'Acide Naphtalène Acétique (ANA) et de Benzyl Aminopurine (BAP) et de 0,8% d'agar. Le pH du milieu a été ajusté à 5.7 ± 0.1 . Les tubes à essais ayant reçu les explants ont été scellés et entreposés dans la salle de culture. Les paramètres physiques de la salle de culture ont été réglés à une température de 28°C, la luminosité d'intensité 5000 lux assurée par des lampes de types Philips TLD18W et Sibalec FL18W, la photopériode de 16h d'éclairage par jour et l'humidité relative de 80% sont maintenus.



Photo a : Explants 0,2 cm
Planche 2 : Quelques explants à
différentes tailles

Photo b : Explants 1,5 cm
X 40

1.2.3 *Indexation des plantules par PCR*

- *Extraction d'ADN total génomique des plantules régénérées*



L'extraction d'ADN a été réalisée suivant le protocole de CTAB modifiée (Chandrasekar *et al.*, 2017) élaborée par Sambrook (1989). Pour les vivoplants obtenus après quatre-vingt-dix (90) jours et les vitroplants obtenus après 30 jours de culture, l'ADN a été extrait à partir des nervures principales des deuxièmes et troisièmes feuilles. Ainsi, une masse de 200 mg de nervures principales des trois premières feuilles ont été prélevés et broyées dans 1ml du tampon CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide). Le broyat obtenu est versé dans un tube eppendorf de 2 ml incubé à 65°C pendant 90 min. Le chloroforme isoamyl alcool a été ajouté puis une centrifugation du mélange à 12.000 tours/min pendant 15 min a été réalisée. A la phase aqueuse récupérée, a été ajouté l'isopropanol froid (4°C) en vue de précipiter l'ADN. Après une centrifugation à 12 000 tours/min pendant 15 min, la pelote obtenue est rincée trois fois avec 500 µl d'éthanol à 70% par centrifugation pendant 10 min, puis séchée à l'air libre pour permettre l'évaporation de l'éthanol. La pelote séchée a été maintenue dans un volume de 50 µl du TE (Tris-EDTA) une fois concentrée (1X) puis le produit final est conservé à -20°C. Ensuite, une vérification de l'ADN a été faite par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. Après électrophorèse, la visualisation des bandes de fragments d'ADN a été faite sous rayons ultraviolets après trempage du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pendant cinq minutes. Vingt échantillons par cultivars à raison de dix échantillons cultivés sous le germe et dix échantillons témoins ont été utilisés pour le compte des vivoplants. Quant aux vitroplants, dix échantillons par cultivars pour les explants de 1,5 cm d'une part ; et huit et trois échantillons de 0,2 cm respectivement pour les cultivars Sotoumon et Planta d'autre part.



Planche a : Vivoplants



Planche b : Vitroplants



Figure 3: Plantules régénérées à partir desquels les nervures des feuilles ont été prélevées

1.2.4 Amplification par PCR

L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 12,5 µl contenant 2,5 µl d'extrait d'ADN total, 2,5 µl de tampon 5X vert, 0,75 de MgCl₂ (25mM), 0,25 µl de dNTP (10pM), 0,25 µl de chaque amorce (BBTV NF/NR 10 Um), 0,06 de Taq (5u/ µl), 2 µl de modèle (01 :50), 6,44 µl d'eau distillée stérile. Le mélange a été chauffé à 94 ° C pendant 5 minutes, puis 35 cycles à 94 ° C pendant 30 secondes, 55 ° C pendant 30 secondes et 72 ° C pendant 1,5 min ; et enfin 1 cycle à 72 ° C pendant 7 min à l'aide d'un thermocycleur. Les amplifias obtenus après PCR ont été vérifiés sur le gel d'agarose à 1%. Une quantité de 7 µl est déposée sur le gel avec deux contrôles positifs, un négatif, un marqueur moléculaire de taille puis passée à l'électrophorèse à 120V pendant 50 min. La séquence amplifiée correspond à la région ADN-R ayant une taille de 240 pb (Kumar *et al.*, 2011) (Tableau 1).

Tableau 1: Amorces utilisées pour la détection de BBTD

Virus	Amorces	Séquences (5'-3')	Taille (nt)	Séquence (pb)	Réf
BBTV	-1	GCGTCAAACGCAC AAAAGGCC	21	240	Kumar <i>et al.</i> (2011) Ngatat <i>et al.</i> (2017)
BBTV	-2	GCATACGTTGTCAA ACCTTCTCCTC	25		

1.2.5 Dispositif expérimental et paramètres évalués

Chacune des expérimentations a été conduite dans un dispositif complètement aléatoire avec deux répétitions et a porté sur la mise en culture de 10 explants par traitement. L'état sanitaire des vivoplants et vitroplants régénérés, les taux de débourement et de régénérescence sont les paramètres évalués. Ainsi, l'état sanitaire des vivoplants a été évalué par l'observation de la présence/ absence des symptômes de la maladie du bunchy top au niveau de leurs feuilles tandis qu'au niveau des vitroplants, l'état sanitaire a été évalué par indexation au PCR. Quant aux taux de



débourrement et de régénérescence, ils ont été évalué par le comptage du nombre de méristèmes/Apex ayant repris et survécu. Le taux de débourrement et de régénérescence ont été obtenus par la formule suivante :

Taux de débourrement (%) = (Nombre d'explants débourrés / Nombre d'explants ensemencés) X 100

Taux de régénérescence (%) = (Nombre d'explants régénérés / Nombre d'explants ensemencés) X 100

1.2.6 Analyses des données

Le logiciel STATISTICA version 6.31 a été utilisé pour les analyses statistiques des données Afin de comprendre l'influence de la taille de l'explant et du cultivar sur l'aptitude de régénération et de survie, une régression logistique binaire a été réalisée. Pour évaluer la variabilité du taux moyen de débourrement entre les explants d'une part et les cultivars d'autre part, l'analyse des variances a été effectuée. Les graphes ont été construits par le classeur Excel 2013.

II- RESULTATS

2.1 Etat sanitaire des vivoplants régénérés dans la serre sous différentes températures

Cultivés à température ambiante, les bulbes de bananiers et plantains ensemencés ont donné des vivoplants tant pour le lot sous germe que pour le lot témoin. Les symptômes de la maladie de Bunchy Top (BBTD) sont observés sur les rejets issus des deux lots avec les plus hauts niveaux de sévérité. Il s'agit de la taille réduite de feuilles décolorées et de l'aspect touffu au sommet « Bunchy Top » sur les vivoplants (Figure 4). Ainsi donc le BBTV est toujours présent dans les vivoplants.

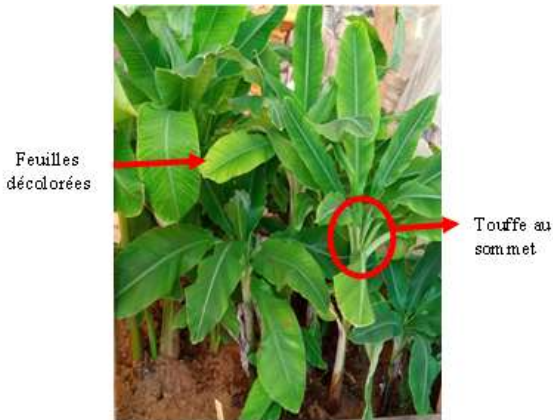


Figure 4: Symptômes de la maladie de Bunchy Top sur les vivoplants régénérées par la technique de PIF

2.1 Indexation virale par PCR attestant la présence du BBTV sur les vivoplants

Les analyses moléculaires ont confirmé la présence effective du Bunchy Top Virus (BBTV) au niveau des deux types de vivoplants. Ces résultats révèlent donc que la température élevée utilisée dans la présente étude n'a pas pu éradiquer le BBTV (Figures 5).

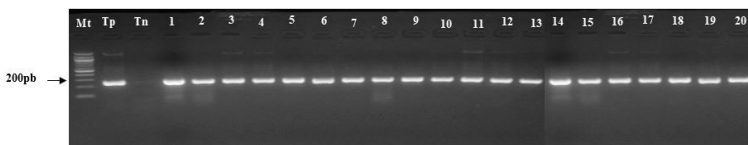


Figure 5: Profil électrophorétique montrant la présence du BBTV révélée par les amorces BBTV1 et BBTV2 sur les vivoplants de Sotoumon

Mt : Marqueur de taille ; *Tp* : Témoin positif ; *Tn* : Témoin négatif ; 1-10 : vivoplants obtenus sous germeoir à température de 40°C à 42°C ; 11-20 : Vivoplants obtenus en serre à température ambiante.

2.2 Influence de la taille et du cultivar sur le débourrement des explants

Les résultats ont montré une différence significative entre les réponses des



explants, des cultivars ainsi que l'interaction Explants*cultivars ($p=0,0193$) vis-à-vis du débourrement (Tableau 2). Ainsi, les explants de 0,2 cm et de 1,5 cm ont présenté 100% de taux de débourrement avec le cultivar Sotoumon. Les pourcentages de débourrement des explants de 0,2 cm et de 1,5 cm du cultivar planta sont respectivement de 100% et 60% (Figure 6). A partir de ces résultats, il est à noter que les explants de 1,5 cm ont une très bonne aptitude de débourrement comparativement aux explants de 0,2 cm. Le cultivar Sotoumon répond plus que le cultivar planta.

Tableau 2: Analyse des variances du taux de débourrement en fonction de cultivar et de l'explant

Source	DD L	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Explants	1	4000	4000	6	0,0193 *
Cultivars	1	4000	4000	6	0,0193 *
Explants*cultivars	1	4000	4000	6	0,0193 *

DDL : Degré de liberté, * Significativité au seuil de 0,1%,

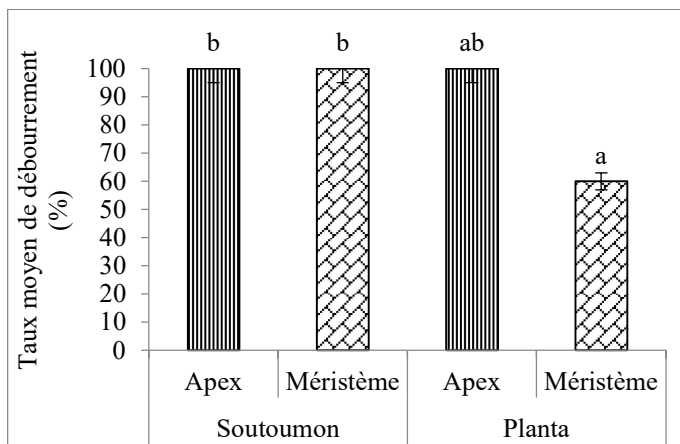


Figure 6: Effet de l'explant et du cultivar sur le débourrement



2.3 Influence de la taille et du cultivar sur le taux de régénérescence des explants

D'après les probabilités associées aux tests de Khi2 ($P < 0,0001$), les résultats de la régression logistique ont révélé que la régénérescence a été très significativement influencée par les variables cultivars et taille de l'explant (Tableau 3). Ainsi, le cultivar Planta a donné le plus faible taux de régénérescence (65%). Par contre le plus fort taux de régénérescence (90%) a été obtenu avec le cultivar Sotoumon (Figure 7). Concernant la taille de l'explant, les résultats ont montré que le plus faible taux de régénérescence (55%) a été obtenu avec les explants de 0,2 cm, tandis que les explants de 1,5 cm ont donné un taux plus élevé (100%) (Figure 7). Les explants de 0,2 cm du cultivar Sotoumon ont le plus fort taux de régénérescence (80%) et ceux du cultivar planta le faible taux (30%) au moment où les explants de 1,5 cm ont présenté le taux de régénérescence le plus élevé (100%) chez les deux cultivars (Figure 7). Par ailleurs, il a été également noté que la régénérescence est significativement influencée l'interaction Explants*cultivars ($p=0,0184$) (Tableau 3).

Tableau 3: Régression logistique binaire présentant l'effet de cultivar et de l'explant sur la régénérescence

Source	DD L	Khi ² (Wald)	Pr Wald	> Khi ² (LR)	Pr > LR
Explants	1	532,870	< 0,0001	1779,957	0,0001***
Cultivars	1	4,614	0,0317	626,560	< 0,0001***
Explants*Cultivars	3	6250	6250	6,081	0,0184*

DDL : Degré de liberté, * Significativité au seuil de 0,1%,

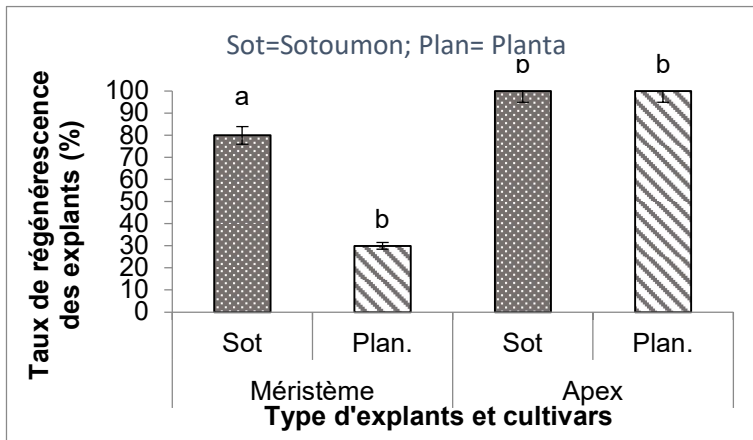


Figure 7: Effet du cultivar et du type d'explant sur le taux de régénérescence des explants

Influence de la taille des explants initiés *in vitro* sur l'élimination du BBTV

Les résultats de l'analyse moléculaire montrent que les plants obtenus à partir des explants de 1,5 cm ont présenté une forte présence du virus de Bunchy Top (Figures 11 et 12). Quant aux plants obtenus à partir des explants de 0,2 cm, une réduction de la charge virale est observée (Figure 13). La culture *in vitro* d'explants de 1,5 cm n'a pas favorisé l'éradication du BBTV. Cependant, la culture *in vitro* d'explants de 0,2 cm réduit la charge virale.

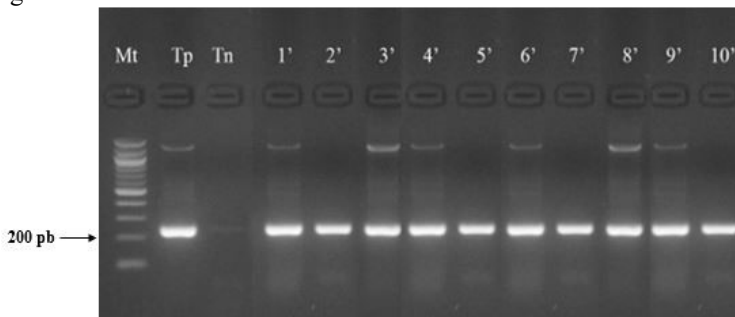


Figure 8 : Profil électrophorétique montrant la présence du BBTV révélée par les amorces BBTV1 et BBTV2 sur les vitroplants à partir des explants de 1,5 cm

Mt : Marqueur de taille ; *Tp* : Témoin positif ; *Tn* : Témoin négatif ;

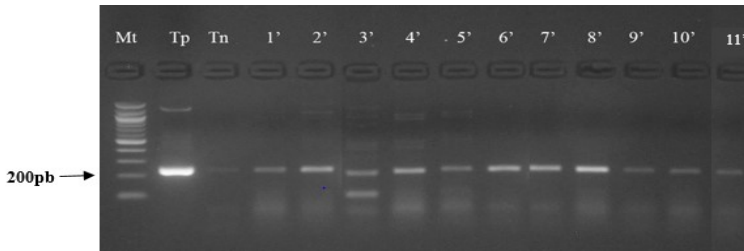


Figure 9 : Profil électrophorétique montrant la présence du BBTV révélée par les amorces BBTV1 et BBTV2 sur les vitroplants obtenus à partir des explants de 0,2 cm.

Mt : Marqueur de taille ; *Tp* : Témoin positif ; *Tn* : Témoin négatif ; 1'-8' : Echantillons de sotoumon ; 9'-11' : Echantillons de Planta.

III- DISCUSSION

Le résultat de la technique de PCR sur la détection du BBTV chez les vitroplants obtenus à la chaleur a révélé que la chaleur dans le germe n'a pas pu éliminer le virus de Bunchy Top. Des résultats similaires ont été obtenus par Tchatchambe *et al.*, 2019 qui ont montré que lors de la technique de PIF, un faible taux d'élimination du virus se traduisant par son absence dans certains des échantillons a été observé en utilisant le test ELISA. La présence du virus dans tous les vitroplants révélée par l'analyse moléculaire par PCR dans ce travail prouve que cette analyse est plus fiable que le test ELISA. A la température de 40 à 42°C notée dans le germe, certains virus sont éliminés par la température au cours de la thérapie c'est le cas du virus de la mosaïque du manioc (Cacaï *et al.*, 2013). De même, Wasswa *et al.* (2010) ont montré que la thérapie est très efficace pour l'élimination des symptômes de la virose sur certaines variétés de manioc car la forte température détruit les processus chimiques dans le cycle de vie des virus, ce qui n'est pas le cas dans la présente étude. On pourrait ainsi formuler le postulat selon lequel le virus du Bunchy Top du Bananier serait peut-être thermorésistant. De plus, avec la



macropropagation, de gros explants sont utilisés. Ce qui rend difficile la sanitation, car elle aspire à de petite taille de l'explant que possible. Selon Tchatchambe *et al.* (2019), plus l'explant est gros, moins l'assainissement complète est possible et inversement.

En ce qui concerne la phase d'établissement *in vitro* des deux cultivars (Sotoumon et Planta), l'étude a permis aussi de savoir les facteurs liés au débourement et à la régénérescence *in vitro* des vitroplants des deux cultivars. Ainsi, le taux de débourement et de survie obtenu ont varié en fonction de la taille de l'explant et du cultivar. En effet, il a été observé que les explants ayant une taille de 1,5 cm ont présenté une bonne aptitude à la régénération *in vitro* que les explants de 0,2 cm. La taille de l'explant joue un rôle important dans les mécanismes de régénérescence et de survie car plus le matériel est petit, plus les tissus et les cellules sont fortement exposés aux stress causés par la dissection du matériel végétal, lesquels pourraient engendrer leur nécrose. Ce même constat a été rapporté par Wang et Valkonen (2007) lorsqu'ils affirment que la réussite à la régénérescence et à la survie de l'explant augmente au fur et à mesure que la taille augmente. S'agissant des cultivars, « Sotoumon », ils ont présenté une meilleure réactivité que « Planta ». Cette variation de réponse entre cultivars peut être due à la différence de la constitution génomique de ces derniers, ce qui serait une source possible de différentes réactions physiologiques. Ce constat d'effet du génotype a été déjà rapporté par d'autres auteurs (Ahanhanzo *et al.*, 2008 ; Gandonou *et al.*, 2012).

L'étude a permis de savoir également que l'état sanitaire des vitroplants de bananier et plantain issus de la culture *in vitro* a été fonction de la taille de l'explant. En effet, les vitroplants issus des explants de 0,2 cm avaient de faible charge virale contrairement à ceux issus des explants de 1,5 cm de taille. La petitesse du méristème (Yin *et al.*, 2007) et le retranchement des primordia (Wang et Valkonen, 2007) favoriseraient l'obtention de matériels de plantation sains. La faible charge virale observée chez les vitroplants issus de la culture des explants de 0,2 cm s'explique par la difficulté liée à la dissection du méristème quand on part du matériel végétal ayant une forte charge virale comme dans le présent travail en ce sens que le risque que le manipulateur contamine les tissus plus proches du méristème est très élevé. En effet, selon Lassois *et al.* (2013), la culture du méristème est la procédure la plus efficace pour l'éradication des virus associés au phloème



étant donné que les particules virales situées dans le phloème ne peuvent probablement pas envahir les tissus méristématiques car il n'y a pas de différenciation cellulaire dans cette zone. Dans le cas de BBTV, connu pour être associé au phloème (Magee, 1939), la culture du méristème à partir de bananiers *in vitro* (*Musa acuminata*, AAA, cv Williams) s'est avérée très efficace, résultant en 99% de plantes indemnes de maladie. Les vitroplants ayant une faible charge virale révélée par la PCR pourront alors servir à produire d'autres vitroplants sur plusieurs subcultures afin d'éliminer totalement le virus.

CONCLUSION

Dans le contexte actuel de la propagation du virus du Bunchy Top dans les plantations des bananiers et plantains, il est nécessaire de développer des méthodes permettant de produire des plantes saines qui pourront être utilisés par les producteurs afin de réduire progressivement l'incidence de ce virus sur la culture de cette spéculacation non moins négligeable au Bénin. Cette étude a mis en évidence l'effet de la chaleur lors de la macropropagation et de la suppression des primordia au cours de la culture *in vitro* sur l'éradication du virus du Bunchy Top chez des vivopants et vitroplants des cultivars « Sotoumon » et « Planta » de bananiers et plantains cultivés au Bénin.. L'intérêt de ce travail réside dans le fait que la mise au point des techniques de multiplication en masse des plants sains peut contribuer à l'amélioration de la production de bananier en quantité et en qualité permettant ainsi d'améliorer la sécurité alimentaire. Les résultats qui en résultent montrent que la chaleur (40°C à 42°C) n'a pas éradiqué les symptômes de la maladie de bunchy top lors de la macropropagation par la technique de PIF. Par rapport aux plants obtenus en culture *in vitro*, une réduction de la charge virale est obtenue avec la culture de méristème contrairement à la culture d'apex. Les méristèmes accompagnés de quelques ébauches foliaires ont présenté une bonne amélioration d'état sanitaire des vitroplants. Ainsi, ceux-ci pourront servir à produire d'autres vitroplants sur plusieurs subcultures afin d'éliminer totalement le virus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ahanhanzo C, Agbangla C, Agassounon C DTM, Cacaï G, (2008). Etude comparative de l'influence des régulateurs de croissance sur la



- morphogénèse (*in vitro*) de quelques variétés de *Manihot esculenta* Crantz, Rev. CAMES - Série A. 7: 40-45.
2. Arias P, Dankers C, Liu P, Pilkauskas P, (2003). L'économie mondiale de la banane 1985- 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 102p.
 3. Bangata B. N., Mbunzu M. K. N., Kasongo M., Shungu D., Vuvu K., Vangu P., Omondi A., Staver C., (2018). Évaluation du potentiel prolifératif de six cultivars de bananier (cv. AAB, ABB, et AAA) par macropropagation en République Démocratique du Congo Journal of Applied Biosciences 127: 12770-12784.
 4. Cacaï GHT ; Adoukonou-Sagbadja H, Kumulugui BS, Ondo Ovono P, Houngue J, Ahanhanzo C (2013). Eradication of cassava (*Manihot esculenta*) mosaic symptoms through thermotherapy and meristems cultured *in vitro*. International Journal of Agronomy and Plant Production 4(numéro spécial): 3697-3701.
 5. Caruana M. L. (2004). *Banana bunchy top babuvirus* - BBTV. Référence BAN-v1. In : Analyses de risque phytosanitaire : appui à la rédaction de la réglementation spécifique aux départements d'outre-mer. Mourichon Xavier, Camou Romain, Ehret Pierre. CIRAD, CEE-POSEIDOM, France-Ministère de l'agriculture et de la pêche. Montpellier : CIRAD, 31 p.ricaine des Sciences des Cultures
 6. Chandrasekar A., Kalaiponmani K., et Angappan K., (2017). Banana Bunchy Top Viral Coat Protein (CP) Gene Expression Studies at Molecular Level in Hill Banana cv. Sirumalai (AAB). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6 (6): 398-411.
 7. Faostat.org (2019). <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL>
 8. Gandonou C. B., Ahanhanzo C., Agbangla C., Agbidinokoun A., Doussouh A., Cacaï G. et Dossoukpevi R. (2012). Micropropagation *in vitro* de la variété locale « Aloga » du bananier plantain (*Musa x paradisiaca* L.) au Bénin. International Journal of Biological and chemical Sciences
 9. Helliot B., Panis, B., Poumay, Y., Swennen, R., Lepoivre, P., & Frison, E. (2002). Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). Plant Cell Reports 20: 1117-1122.
 10. Holmes FO ; Hendrix JW ; Ikeda W ; Jensen DD ; Lindner RC ; Étage WB, 1948. Tache annulaire de papaye (*Carica papaya*) dans les îles Hawaï. Phytopathologie, 38:310-312.



11. Kumar, PL, Selvarajan, R., Iskra-Caruana, ML, Chabannes, M., & Hanna, R. (2015). Biologie, étiologie et contrôle des maladies virales du bananier et du plantain. *Avancées dans la recherche sur les virus*, 91, 229-269.
12. Kumar, P.L., Hanna, R., Alabi, O.J., Soko, M.M., Oben, T.T., Vangu, G.H., (2011). Banana bunchy top virus in sub-Saharan Africa: Investigations on virus distribution and diversity. *Virus Research* 159: 171–182.
13. Lassois L., Lepoivre P., Swennen R., van den Houwe I., Panis B. (2013). Thermo-therapy, chemotherapy, and meristem culture in banana. In: Lambardi M., Ozudogru A.E., Jain S.M. (Eds.), *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants* New York: Springer Science +Business Media. (pp. 419–433).
14. Lassoudière A., (2007). *Le bananier et sa culture*. Versailles, France : Éditions Quae
15. Li W.B., Hartung J.S., Levy L. (2006) Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104–115.
16. Lockhart, B. E. L., Jones, D. R. (1999). Virus de la strie de la banana. In: Jones D. R. *Diseases of banana, abaca and enset*. Wallingford, Royaume-Uni éditions CAB, 263-274
17. Lokossou B., Gnanvossou D., Ayodeji O., Akplogan F., Safiore A., Migan D. Z., (2012). Occurrence of banana bunchy top virus in banana and plantain in (*Musa* sp.) in Benin. *New Disease Reports* (2012) 25, 13.
18. Lassois L, Busogoro JP, Haïssam J (2009). La banane : de son origine à sa commercialisation. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13(4): 575- 586.
19. Magee L. I., Garnier M. et BOVE J.M. (1939) Purification of banana bunchy top virus (BBTV). *Fruits* - vol. 44, n° 2, 1989
20. Mialoundama Bakouétilla G.F., Berton Ofoouémé Y., Tchouamo I.R., Boukoulou H., Folefack D. P., Mbemba F., Loubelo A.B., Makouya H., Mbougou Z. (2016). Analyse des déterminants de la consommation de la banane (*Musa* sp.) à Brazzaville, République du Congo. *Journal of Animal & Plant Sciences* 31(1): 4864-4873.
21. Ngama Boloy F.N., Nkosi B.I., Losimba J.K., Bungamuzi C.L., Siwako H.M., Balowe F.W., Lohaka J.W., Dhed'a Djailo B., Lepoint P., Sivirihauma C., Blomme G. (2010). Assessing incidence, development and distribution of banana bunchy top disease across the main plantain



- and banana growing regions of the Democratic Republic of Congo. *African Journal of Agricultural Research* 9(34):2611-2623.
22. Ngatat S., Hanna R., Kumar P.L., Gray S.M., Cilia M. Ghogomu R.T., Fontem D.A. (2027) Sensibilité relative des génotypes de *Musa* à la maladie du Bunchy top du bananier au Cameroun et implication pour la gestion de la maladie. Elsevier 101 (116-122)
 23. Nkendah R. and E. Akeyeampong. 2003. Données socioéconomiques sur la filière plantain en Afrique Centrale et de l'Ouest. *Infomusa* 12 (1) : 8 - 13.
 24. Oben T.T., Hanna R., Ngeve J., (2009). Occurrence of banana bunchy top disease caused by the banana bunchy top virus on banana and plantain (*Musa* sp.) in Cameroon. *Plant Disease*; 93:1076–1076.
 25. Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Carra, A., Carimi, F., & Panis, B. (2013). Elimination des virus de l'enroulement des plants de vigne infectés par vitrification par gouttelettes. In VIII Symposium international sur la culture in vitro et la sélection horticole 1083 (pp. 491-498).
 26. Sambrook, J. (1989). Amplification in vitro de l'ADN par amplification en chaîne par polymérase. Clonage moléculaire. Un manuel de laboratoire.
 27. Susan H., E., & Baker C. A., (2015). Banana bunchy top virus and its vector *Pentalonia nigronervosa* (Hemiptera: Aphididae). *Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry Pathology Circular, 417*(8).
 28. Swennen R. et Vuylsteke D. (2001). Bananier Raemarkers, H.R (éd.) *Agriculture en Afrique Tropicale*. DGCI, Bruxelles, 611-636
 29. Tchatchambe J. N., Francine B. K, Joseph G. A, Didy O. O, Swennen R., and Dhed'a B. D. (2019). Production of bbtv-free plants by micropropagation and macropropagation in kisangani, dr Congo. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 26 (2): 498-502
 30. Temple, L., Bikoï, A., & Chataigner, J. (1997). La consommation de banane plantain au Cameroun. *Cahiers de la Recherche-Développement* (44) : 73-85.
 31. Wang Q. et Valkonen J.P.T. (2007). Elimination of viruses and phytoplasma by cryotherapy of in vitro-grown shoot tips: Analysis of all cases. *Advances in Horticultural Science* 21(4):. 265-269
 32. Wang Q.C, B. Panis, F. Engelmann, M. Lambardi et J.P.T. Valkonen. (2008). Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication



- to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology* 154 (3); 351-363.
33. Wasswa P., Alicai T., Mukasa S.B. (2010). Optimisation of *in vitro* techniques for Cassava Brown Streak Virus elimination from infected cassava clones. *Revue Africaine des Sciences des Cultures* 18: 235 – 241.
 34. Yin Z. C., Feng B., Wang Q., Wang., Engelmann F., Lambardi M., Panis B., (2011). Cryotherapy of Shoot Tips: a Newly Emerging Technique for Efficient Elimination of Plant Pathogens Proc. First IS on Cryopreservation in Hort. Species Eds.: B. Panis and P. Lynch Acta Hort. 908, ISHS.