

REGENERATION *IN VITRO* PAR ORGANOGENESE DIRECTE D'*ALLIUM CHINENSE* (LEGUME) A PARTIR DES FRAGMENTS DE CES BULBES

Amadou Apho Bah^{1, 2*},
Abdou Malle²,
Aly Kansaye²

¹Zhejiang University, College of Agriculture and Biotechnology,
China

²Institut Polytechnique Rural de Formation et de Recherche Appliquée IPR/IFRA
Katibougou- Mali

* Corresponding author's email address: aphobah@yahoo.fr
Tel : 00223 76488420

Résumé

Allium chinense est une plante récalcitrante à la multiplication sexuée. Les moyens biotechnologiques par l'organogenèse restent la voie de recours à son amélioration. Afin de tester le potentiel de régénération *in vitro* du bulbe de cette plante des tests de cultures ont été réalisés sur le milieu de base de Muraschige et Skoog (MS) (1962). L'influence de plusieurs facteurs sur la régénération de matériel végétatif à savoir l'effet des méthodes de désinfection, et des apports de phytohormones ont été étudiés. En effet, les meilleurs taux d'explants non contaminés ont été enregistrés avec le traitement de 0,1% HgCl₂ pendant 15 min. D'un autre côté, les meilleurs taux de régénération ont été constatés en présence d'une concentration moyenne (2mg /l) de BA dans le milieu de culture.

Mots clés : *Allium chinense*, régénération *in vitro*, bulbe, désinfection, phytohormones, milieu de culture

Abstract

Allium chinense is a recalcitrant plant with a sexual reproduction. Biotechnological means through organogenesis remain the remedy for its improvement. In order to test the organogenetic potential of the bulb of this plant *in vitro* cultures were carried out on MS basal medium (1962). The influence of several factors on the reactivity of vegetative material, namely the effect of disinfection methods, and the contribution of phytohormones, were studied. Indeed, the best levels of uncontaminated explants were recorded with the treatment (0.1% HgCl₂ for 15 min. The best organogenetic reactivity rates were observed in the presence of a mean concentration (2 mg / l) of BA in the culture medium.

Keywords: *ALLIUM chinense*, *in vitro* plant regeneration, bulb, phytohormones, culture medium

1. Introduction

(*Allium chinense* G. Don), encore appelé « jiaotou » en langue chinoise, une plante vivace appartenant à la famille des Alliacees. Cette plante est consommée comme légume (Chen 1989). En raison de sa composition phytochimique, elle est également utilisée comme médicament traditionnel pour améliorer la santé physique et mentale (Kameoka et al., 1984,

Kuroda et al., 1995, Peng et al., 1996). *Allium chinense* se reproduit naturellement par multiplication végétative, bien qu'il fleurisse habituellement dans des conditions naturelles. La plante ne parvient pas à former les graines à cause de sa stérilité due à l'avortement de ses fleurs (Du et al. 1993, Brewster, 1994). La stérilité et les dysfonctionnements floraux observés chez « jiaotou » sont éventuellement associés à des aberrations chromosomiques (Du et al, 1993). La faible aptitude de se reproduire par la méthode conventionnelle, notamment la reproduction sexuée constitue un frein pour le développement la culture et les recherches génétiques chez cette plante. En outre, la reproduction par la voie asexuée (végétative) s'avère être un long processus et constitue une source d'infection virale des cultivars. La culture des tissus est généralement une alternative à la régénération végétative des plantes. Différents organes de la plante peuvent être utilisés comme explants initiaux pour la régénération des plantules. La culture in vitro a été réalisée avec succès pour de nombreuses espèces d'*Allium* à partir d'une gamme de sources d'explants, y compris la tige (Mukhopadhyay et al., 2005; Luciani et al., 2006), jeunes feuilles (Nagasawa et Finer, 1988) (Kehr et Schaeffer, 1976), des fragments de bulbes (Koch et al., 1995; Luciani et al., 2006) et des organes foraux (Luthar et Bohanec, 1999; Luciani et al., 2006), racine (Haque et al. , 1997; Myers and Simon, 1998; Barandiaran et al., 1999; Kim et al., 2003; Luciani et al., 2006) et des pollens immatures (Luciani et al., 2006) à travers un certain nombre de méthodes comme la culture de suspension cellulaire (Fereol et al., 2005) et la culture de protoplastes (Ayabe et al., 1995).

Le genre *Allium* est généralement multiplié par voie végétative en raison de la stérilité des organes floraux. Cette caractéristique est un facteur limitant dans le programme de recherches agronomiques sur ces plantes. En plus la contamination et les infections virales (mosaïque) sont très souvent observées au cours de la reproduction végétative. Cela réduit considérablement la production (Ma et al. 1994).

L'objectif de cette étude est de d'élaborer un protocole efficient de la technique de micropropagation d'*Allium. chinense* via la régénération in vitro des fragments de bulbe de la plante.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Matériel végétal

Les bulbes d'*Allium. chinense* ont été collectés dans la station expérimentale de l'Université d Zhejiang.

2.2 Désinfection du matériel végétal

Trois méthodes de désinfection ont été testées :

- 75% d'éthanol pendant 5 minutes,
- 75% d'éthanol pendant 30 s, suivi d'un trempage dans 0,1% de HgCl₂ pendant 15 min
- 75% d'éthanol pendant 30 s, suivi d'un trempage dans du NaCl 0 à 10% pendant 20 min.

Afin d'éliminer les traces du détergeant, les explants sont rincés 3 fois pendant 5 minutes avec de l'eau distillée stérile.

2.3 Conditions de culture

Après désinfection, les bulbes sont découpés à l'aide d'une lame stérile en petits fragments de 0,5 à 1 cm de long. Les explants sont par la suite repiqués dans des flacons contenant 20 ml de milieu nutritif à raison de 2 à 3 explants par flacon. L'ensemble des opérations de désinfection et de repiquage est effectué sous hotte à flux laminaire. Les cultures sont placées dans une chambre éclairée avec une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures. La température au tour des récipients est de 25 °C.

Les cultures ont été maintenues pendant huit semaines. Le taux d'explants non contaminés et le pourcentage d'explants formant des pousses ont été enregistrés. Chaque traitement contenait 35 explants avec trois répétitions.

2.4 Milieux d'initiation

Les fragments de bulbes sont ensemencés sur le milieu de culture MS contenant 1,0 mg / l de BA et 1,0 mg / l de NAA, 30 g / l de saccharose, 7 g / l d'agar, Le pH a été ajusté à 5,8. Après quatre semaines d'inoculation, l'explant a induit de multiples pousses sur le milieu, qui ont ensuite été fragmentés et utilisés comme explants secondaires pour la culture ultérieure.

2.5 Milieux de prolifération

Après quatre semaines de culture sur le milieu d'initiation, les jeunes pousses sont transférées sur les milieux de prolifération MS contenant les phytohormones BA (0,5, 1,0, 2,0 et 3,0 mg / l) et NAA (0,1 mg / l).

2.6 Observations et mesure :

Les données sur les paramètres d'appréciation tels que le taux de non contamination, la réactivité des explants et la prolifération des pousses sont régulièrement collectées.

Ces observations qualitatives et quantitatives sont données sous forme de moyennes à l'effectif total observé.

2.7 Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel SAS pour Windows (SAS Institute, 1999). Les valeurs moyennes ont été calculées et ont été comparées par les tests de Duncan 5%.

3. Résultats et Discussion

3.1 Effet de l'agent désinfectant

Une bonne désinfection du matériel végétatif du départ assure une production en qualité et quantité des vitro plants. A cet effet, nous avons utilisé un agent désinfectant très efficace, il s'agit du chlorure mercurique (*Hge12*). Nos résultats obtenus montrent l'effet bénéfique (figure 1) de cet agent stérilisant sur le taux de non contamination (75,03%) des explants mis en culture.

L'efficacité du chlorure de mercure comme agent désinfectant est confirmée par plusieurs chercheurs sur plusieurs essences végétales notamment le *Merrisier* (RIFFAUD et CORNU, 1981), et le Noyer (BENMAHIOUL, 2001).

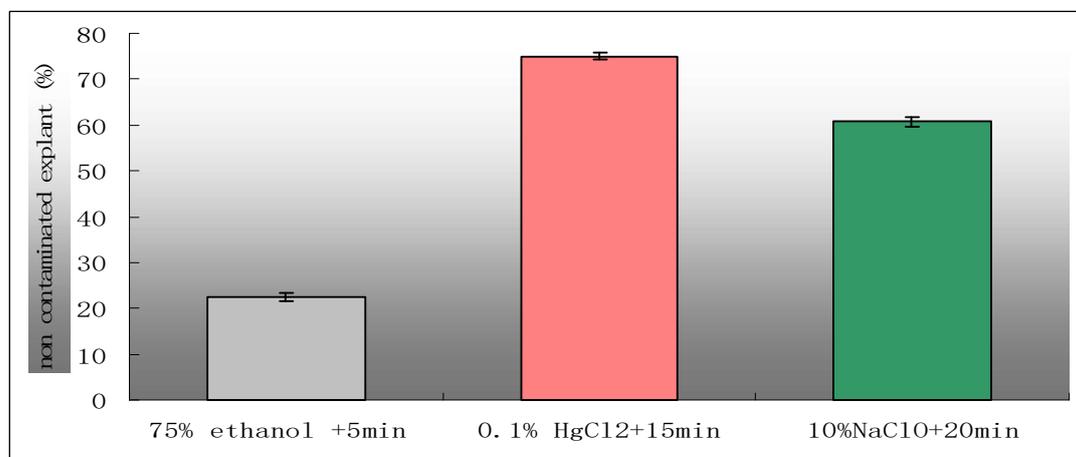


Fig : 1. Effet des méthodes de désinfection sur le taux d'explants non contaminés

Le taux d'explants non contaminés après 7 jours de culture. Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions.

3.2 Effet des phytohormones

Afin de déterminer le meilleur traitement hormonal, nous avons testé deux phytohormones (BA, et NAA) à différentes doses allant de 0,1 mg/l à 3 mg/l. Le milieu de base est constitué des macroéléments, microéléments et vitamines de MS, le saccharose à la dose de 30 g/l et l'agar-agar à la concentration de 7 g/l. L'analyse du tableau 1 montre l'effet de la nature et la dose hormonale sur la réactivité des explants introduits in vitro. En effet, le meilleur taux de débourrement des bourgeons (**98%**) a été obtenu en présence de la BA à la dose de 2 mg/l.



Prolifération des pousses



Réactivité des explants

Photo 1

Cependant le pourcentage de réactivité diminue en présence des doses supérieures ou inférieures à 2 mg/l.

En ce qui concerne l'aspect qualitatif, les meilleures microboutures ont été obtenues avec la présence de BA (Photo 1). Par conséquent BA à la dose de 2 mg/l a été retenu pour la suite de nos essais.

Tableau 1. Effet de la combinaison hormonale (BA +ANA) sur la réactivité des explants

Hormone de croissance (mg/l)		Reaction organogenique des explants (%)
BA	ANA	
0,5	0,1	77,1
1,0	0,1	79,5
2,0	0,1	98
3,0	0,1	69,4

Conclusion

La formule contenant le désinfectant Hgcl₂ est bénéfique que ce soit sur le taux de non contamination ou celui de la réactivité des explants mis en culture. La nature et la dose hormonale impactent significativement sur la réactivité des explants introduits in vitro. Le bulbe constitue une excellente source d'explant pour l'obtention des vitroplants d'*ALLIUM* chinense. Au cours de ce travail, nous avons constaté la réactivité est liée non seulement à la nature du type d'explant mais aussi à la composition hormonale du milieu de culture. En effet, les meilleurs résultats ont été enregistrés chez les explants cultivés en présence de la formulation minérale et organique de MS enrichie de la Benzyladénine (BA) à la dose de 2 mg /l.

References

- Ayabe M, Sumi S. 1998: Establishment of a novel tissue culture method, stem- disc culture and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep*, 17, 773–779
- Barandiaran X, Martin N, Rodriguez-conde MF, di-Pietro A, Martin J. 1999: An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Hort Sci* 34, 348–349
- Barandiaran X, Martin N, Rodriguez-Conde MF,. Di Pietro A, Martin J. 1999: Genetic variability on callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 18, 434-437
- Benmahioul B. 2001: *Contribution à l'étude de la multiplication végétative in vitro du noyer commun* (*Juglans regia* L.). Thèse, magistère. Départ, foresterie. Université de Tlemcen, 85 pages
- Brewster JL 1994: Onions and other vegetable Alliums, *CABI*,
- Chen JF 1989: Introduction to *Allium chinense*. *China Veg* 4, 47-49

- Chen JF, Cui L, Malik AA, Mbira KG. 2011: In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104, 311-319
- Du WF, Xiong JQ, Xu X .1993: Studies on karyotypes of four Chinese scallions (*Allium chinensis* G. Don). *J Wuhan Bot Res* 11, 199–203
- Fereol L, Chovelon V, Causse S, Triaire D, Arnault I, Auger J, Kahane R. 2005: Establishment of embryogenic cell suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.), plant regeneration and biochemical analyses. *Plant Cell Rep* 24, 319–325
- Finer, JJ, Reilley, AA, Smith, RH. 1987: Establishment of embryogenic suspension cultures of a wild relative of cotton (*Gossypium klotzschianum* Anders.). *In Vitro Cell Dev Biol* 23, 717–722
- Finer, J.J. 1988: Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean. *Plant Cell Reports*. 7, .238-241.
- Gamborg O, Miller R, Ojima K .1968: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151-158
- Haque, M.S . Wada, T. and Hattori, K. 1998: Efficient plant regeneration in Garlic through somatic embryogenesis from root tip explants. *Plant Prod Sci*. 1, 216-222
- Hennerty MJ, Upton ME, Harris DP, Eaton RA, James DJ. 1988: Microbial contamination of in vitro cultures of apple rootstocks M26 and M9. *Acta Hort* 225, 129-137
- Kameoka H, Iida H, Hashimoto S. 1984: Sulphides and furanones from steam volatile oils of *Allium fistulosum* and *Allium chinense*. *Phytochemistry* 23, 155–158
- Kehr, A.E . and Schaeffer, G.W. 1976: Tissue culture and differentiation of garlic. *Hortic Sci*. 11, 422-423
- Kim et al., 2003 Kim, W. K.; Patterson, P. H. 2003: In situ evaluation of hen mortality meal as a protein supplement for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86 (10), 3337–3342
- Kuroda M, Mimaki Y, Kameyama A, Sashida Y, Nikaido T. 1995: Steroidal saponins from *Allium chinense* and their inhibitory activities on cyclic AMP phosphodiesterase and Na⁺/K⁺ ATPase. *Phytochemistry* 40, 1071-1076.
- Koch et al., 1995; Koch M, Tanami Z, Salomon R .1995: Improved regeneration of shoots from garlic callus. *Hort Sci* 30, 378
- Luciani GF, Mary AK, Pellegrini C, Curvetto NR. 2006: Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Org Cult* 87, 139–143
- Luthar Z, Bohanec B . 1999: Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Rep* 18, 797-802
- Murashige T, Skoog F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497

Myers and Simon, 1998 Myers JM, Simon PW. 1998: Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. *Plant Cell Rep* 17, 726-730

Peng JP, Yao XS, Tezuka Y .1996: Furostanol glycosides from bulbs of *Allium chinense*. *Phytochemistry* 41, 283-285

Riffaud J.L. et Cornu D., 1981 : Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de merisier (*Prunus avium* L.) sélectionnées en forêt. *Agronomie* 1 (1), 633-640.

Savela ML, Uosukainen M .1994: Characterization of bacteria contaminating tissue cultures of apple rootstock 'YP'. *J App Bacteriol* 76, 68-376.

Tang, QY, Feng, M.G. 1997: Practical Statistics and DPS Data Processing System. China Agric. Press, Beijing.