



Contrôle des germes endogènes par usage d'agents antimicrobiens et réponse de différents explants durant la phase d'initiation *in vitro* de l'ananas (*Ananas comosus* (L.) Mill var. *comosus*)

Bienvu T. BADOU*¹, Justin S. PITA³, Serge S. HOUEDJISSIN¹ et Corneille AHANHANZO^{1,2}

1. Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et d'Amélioration des Plantes ; Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01BP 526 Cotonou (Bénin)

2. Centre Béninois de la Recherche Scientifique et de l'Innovation (CBRSI)

3. Laboratoire de Physiologie Végétale ; Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire)

*Corresponding author : olaoumi01@gmail.com ; Tél : +22995936400

Original submitted in on 11th December 2017. Published online at www.m.elewa.org on 31st January 2018
<https://dx.doi.org/10.4314/jab.v12i1.4>

RÉSUMÉ

Objectif : La culture *in vitro* est aujourd'hui utilisée dans la production massive de rejets d'ananas. Mais, la réussite de sa première phase (initiation) nécessite l'élimination des infections et un bon choix d'explant. Dans la présente étude, l'effet de deux agents antimicrobiens et du type d'explant sur la reprise *in vitro* de l'ananas a été évalué.

Méthodologie et Résultats : Les bourgeons axillaires médians de couronne d'ananas des cultivars *Cayenne lisse* (*Hilo* et *Saint Michael*) et *Pain de sucre* ont étéensemencés sur le milieu de Murashige et Skoog additionné de 5 mg/l de Benzylaminopurine : MC. L'hypochlorite de sodium (0,1 ; 0,2 ; 0,3 et 0,4%) et le Chlorothalonil (0,075 ; 0,15 ; 0,225 et 0,3%) ont été incorporés au milieu. Ensuite, des bourgeons axillaires médians de 8 à 10 semaines après floraison et ceux des parties supérieure, médiane et basale de 10 semaines ont étéensemencés sur le milieu MC additionné de 0,3% d'hypochlorite de sodium. La présence d'agent antimicrobien a réduit les infections mais avec une influence négative sur la reprise. L'hypochlorite de sodium à 0,3% a permis une meilleure élimination des infections (17,78%) sans significativement affecter la reprise (78,89%). Les contaminations sont plus prononcées chez *Pain de sucre* (37,40%) que chez *Saint Michael* (19,26%) et *Hilo* (9,63%). Les jeunes bourgeons médians des couronnes de 8 semaines et supérieurs de 10 semaines ont présenté une meilleure aptitude au débourrement avec respectivement des taux de 92,22% et 86,67%.

Conclusion et applications : La désinfection de surface généralement effectuée à l'initiation ne permet pas d'éliminer efficacement les infections chez l'ananas. L'introduction d'agent antimicrobien dans le milieu de culture a réduit les infections mais a eu un effet négatif sur le débourrement aux doses croissantes. L'utilisation des bourgeons axillaires supérieurs et médians de couronne de 8 semaines après floraison est souhaitée pour optimiser la reprise *in vitro* de l'ananas.

Mots clés : Ananas, hypochlorite de sodium, chlorothalonil, position de l'explant, âge de l'explant, désinfection, débourrement.

Endogenous germs control using antimicrobial agents and response of different explants during *in vitro* regeneration of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Mill var. *comosus*)

ABSTRACT

Objectives: Tissue culture is currently used in massive production of pineapple shoots. But, the success of its first phase (initiation) requires elimination of infections and a good choice of explant. In this study, the effects of two antimicrobial agents and type of explant on *in vitro* regeneration of pineapple were evaluated.

Methodology and Results : Median part axillary buds of pineapple crown of *Smooth Cayenne* (Hilo and Saint Michael) and *Sugarloaf* were seeded on Murashige and Skoog medium supplemented with 5 mg/l Benzylaminopurine : MC. Sodium hypochlorite (0.1, 0.2, 0.3 and 0.4%) and Chlorothalonil (0.075, 0.15, 0.225 and 0.3%) were incorporated into the medium. Subsequently, median axillary buds from 8, 9 and 10 weeks after flowering and buds from proximal, median and distal parts of crown were excised. All of buds were seeded on MC medium supplemented with 0.3% sodium hypochlorite. Presence of antimicrobial agent into the medium reduced infections but has a negative influence on bud burst when doses increase. Sodium hypochlorite 0.3% allowed a good elimination of infections (17.78%) without significantly affecting regeneration (78.89%). Fungal and bacterial contaminations are more pronounced in Sugarloaf (37.40%) than Saint Michael (19.26%) and Hilo (9.63%). Better bud burst in all cultivars were recorded with median and proximal buds providing respectively to crowns aged to eight (92.22%) and ten (86.67%) weeks.

Conclusion and applications: Surface disinfection of pineapple explants during initiation phase does not effectively eliminate all of endogenous infections. Culture medium supplemented with 0.3% sodium hypochlorite highly reduced infections with less significantly affected the bud burst. The use of median and proximal buds provided to crowns harvested eight and ten weeks after flowering respectively is better for increasing the bud burst of pineapple tissue culture.

Keywords : Pineapple, sodium hypochlorite, chlorothalonil, explant position, age of explant, disinfection, bud burst.

INTRODUCTION

L'ananas est l'un des fruits tropicaux majeurs dont la demande sur le marché international connaît un accroissement de nos jours. Sa culture constitue une importante source de revenus pour les populations rurales (Das *et al.*, 2010). Mais sa production intensive nécessite un grand nombre de rejets qui malheureusement sont faiblement produits par la plante (Gnimadi, 2008). Aussi, l'uniformité du matériel de plantation en vue de garantir une production groupée et homogène constitue-t-elle un véritable problème parce que la rareté de rejets conduit à l'utilisation de rejets de différentes natures, de différents calibres et de différentes origines affectant ainsi la qualité de la récolte. Les différentes méthodes de production de rejets n'ont pu améliorer que faiblement le taux de multiplication des rejets d'où l'usage ces dernières années des biotechnologies végétales et précisément de la culture *in vitro* pour la production massive de rejets (Danso *et al.*, 2008 ; Zuraida *et al.*, 2011). La

micropropagation, application de la culture *in vitro* utilisée dans ce cas, se déroule en quatre principales étapes que sont l'initiation, la multiplication, l'enracinement et l'acclimatation. Sa réussite dépend en premier lieu de celle de sa première étape qu'est l'initiation (Daud *et al.*, 2012). Cette dernière nécessite un bon choix du matériel végétal et une bonne élimination des microorganismes avant son ensemencement. En effet, malgré la désinfection de surface des explants, plusieurs cultures du fait des germes (bactéries et champignons) endogènes se retrouvent infectées (Ummey *et al.*, 2002 ; De Silva *et al.*, 2011). De Silva *et al.* (2011) ont montré que l'incorporation de fongicides au milieu de culture était meilleure dans l'élimination des infections que le pré-trempeage et l'ajout de solution de fongicide comme surnageant au milieu de culture gélosé. Ainsi, des agents antimicrobiens (bactéricides et/ou fongicides) sont parfois ajoutés au milieu de culture afin d'éliminer les germes ou d'empêcher leur expression

(Phillips *et al.*, 1981 ; Talukder *et al.*, 2007 ; Reddy *et al.*, 2012). Le chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophtalonitrile), un organochloré est un fongicide de contact, non systémique qui agit plus au début du cycle de développement (germination) des champignons qu'au niveau de la croissance (Bendahmane *et al.*, 1992). Il a été incorporé au milieu de culture chez le manioc (Houngoué *et al.*, 2017). L'hypochlorite de sodium, largement utilisé en phase de désinfection de surface du matériel végétal (Lopez-Aranda *et al.*, 1994 ; Zuraida *et al.*, 2011 ; Dossoukpèvi *et al.*, 2012) a également été introduit dans le milieu de culture chez certaines espèces (Pierik, 1987 ; Rodrigues *et al.*, 2013). L'ananas, du fait de sa forte teneur en sucre, renferme plusieurs germes rendant difficiles sa désinfection en culture *in vitro*. Malgré ce fait, peu de travaux se sont penchés sur l'introduction d'agents antimicrobiens dans les milieux de culture chez l'ananas. Outre les facteurs exogènes tels que les facteurs environnementaux (température, lumière, luminosité, hygrométrie, photopériode) et ceux du milieu de culture tels que la

composition saline et les régulateurs de croissance, des facteurs intrinsèques à l'explant comme la position (Houédjissin *et al.*, 2015 ; Acheampong *et al.*, 2015) et l'âge (Basto *et al.*, 2012) déterminent l'orientation de la culture. L'influence de la position de l'explant chez *Ananas comosus* var. *comosus* fut abordée par Acheampong *et al.* (2015) mais avec des cayeux chez le cultivar Pain de sucre. Or, les explants utilisés chez *Ananas comosus* var. *comosus* et ayant donnés les meilleurs résultats sont les bourgeons axillaires de feuilles de couronnes d'ananas (Omokolo *et al.*, 2001 ; Zuraida *et al.*, 2011 ; Ibrahim *et al.*, 2013 ; Usman *et al.*, 2013). A notre connaissance, aucune étude n'a encore évalué l'influence de l'âge des bourgeons sur le comportement *in vitro* de ces bourgeons chez l'ananas. D'où l'objectif de la présente étude qui a porté sur l'évaluation de l'effet d'agents antimicrobiens (1), de la position des bourgeons axillaires de couronne (2) et de l'âge des fruits (3) sur la reprise *in vitro* chez l'ananas.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal : Le matériel végétal est constitué du cultivar « Cayenne lisse » avec les morphotypes St Michael et Hilo et du cultivar « Pain de sucre », principaux cultivars produits au Bénin. Ils proviennent du champ expérimental du Laboratoire Central des Biotechnologies Végétales et d'Amélioration des Plantes de l'Université d'Abomey-calavi sis dans l'arrondissement de Zinvié, commune d'Abomey-calavi, grande zone de culture de l'ananas au Bénin. Les plants n'ont reçu aucun traitement phytosanitaire surtout antifongique afin de réduire la compétition entre bactéries et champignons qui provoquerait un important développement bactérien lors de la mise en culture (Pannetier et Lanaud 1976). Toutes les manipulations se sont déroulées de Juin à Juillet 2015.

Préparation du matériel végétal et conditions de culture : La désinfection des explants s'est faite suivant le protocole de Almeida *et al.* (2002) modifié par Badou *et al.* (2017) et a consisté successivement à un rinçage des couronnes sous eau courante pendant 10 min, une pré-désinfection des couronnes taillées dans un fongicide multisite préventif et de contact à large spectre d'action, le Jumper 75 DF (Chlorothalonil 750g/Kg) pendant 1 heure. Des cubes d'environ 90 mm³ renfermant un bourgeon axillaire ont été prélevés sur les couronnes

sous une hotte à flux laminaire horizontal. Après un rinçage des bourgeons pendant 2 min dans de l'eau distillée afin d'éliminer les débris, ils ont subi un trempage de 3 min dans de l'alcool éthylique à 70% et un rinçage à l'eau distillée stérile pendant 3 min. Ensuite, les cubes ont été désinfectés pendant 5 mn dans de l'hypochlorite de sodium à 15% (8° de chlore actif) additionné de trois gouttes de tween 20 suivi de trois rinçages de 5 mn chacun. Enfin, les tissus nécrosés par la désinfection ont été taillés pour donner des explants finaux d'environ 70 mm³, lesquels ont subi une légère désinfection dans de l'hypochlorite de sodium à 5% pendant 3 mn et un rinçage d'une minute dans de l'eau distillée stérile. L'ensemble des opérations de désinfection et de repiquage s'est effectué sous hotte à flux laminaire horizontal. Les explants désinfectés sont ensuite ensemencés dans des tubes à essai de 50 x 150 mm contenant 10 ml de milieu nutritif à raison d'un explant par tube. Les tubes ensemencés sont fermés avec du coton stérile, scellés avec du parafilm et placés en culture dans la salle de culture où règnent une température de 27 ± 1°C, une photopériode de 12 heures sous une intensité lumineuse de 5000 lux. L'humidité relative de la salle est maintenue à 80%.

Effet des agents antimicrobiens sur la reprise *in vitro* : Les différents milieux utilisés sont constitués du milieu de base de Murashige et Skoog (MS) (1962) additionné de 30 g/l de sucrose, 5 mg/l de Benzylaminopurine (BAP) et 8 g/l d'agar. Il s'agit du milieu ayant présenté un débourrement moyen à la suite des travaux de Badou *et al.* (2017). Ils varient de par la nature et la dose de l'agent antimicrobien (Hypochlorite de sodium et Chlorothalonil). Neuf (09) différents milieux ont été constitués. Ils sont codés "N" pour l'hypochlorite de sodium (NaOCl, 8° de chlore actif), "C" pour le chlorothalonil, chacun étant suivi de sa concentration massique. On a donc : N₀C₀, N_{0,1}C₀, N_{0,2}C₀, N_{0,3}C₀, N_{0,4}C₀, N₀C_{0,075}, N₀C_{0,15}, N₀C_{0,225} et N₀C_{0,3}. Le pH des différents milieux a été ajusté à 5,7±0,1 avant l'ajout de l'agar. Les explants utilisés sont des bourgeons de la partie médiane

de l'axe de la couronne dans le but d'obtenir une homogénéité des explants quant à leur structure et à cause de leur grand nombre sur l'axe de la couronne.

La clé d'identification de Bioforma (2002) a servi à l'identification des genres de germes responsables des infections.

Influence de l'âge et de la position sur la reprise *in vitro* des bourgeons axillaires de couronne :

L'évaluation de l'effet de l'âge s'est faite avec des bourgeons axillaires médians de couronne de fruits âgés de 8, 9 et 10 semaines après floraison. Pour la position, des bourgeons axillaires de couronne des parties supérieure, médiane et basale ont été prélevés sur des fruits âgés de 10 semaines après floraison. Le milieu utilisé est le même que précédemment mais additionné de 0,3% d'hypochlorite de sodium.

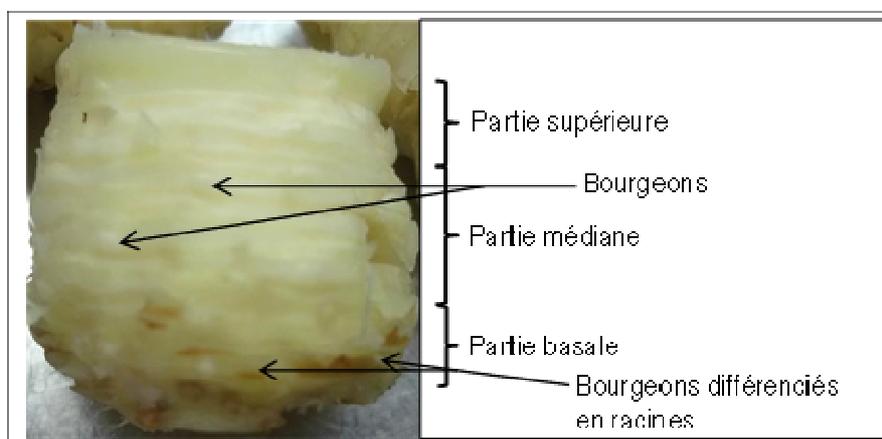


Figure 1 : Position des bourgeons sur l'axe de la couronne

Paramètres évalués

Effet des agents antimicrobiens : Les paramètres évalués pour l'effet des agents antimicrobiens chez chaque cultivar sont :

- la cinétique et les taux d'infections fongique, bactérienne et mixte en fonction du traitement (nature et dose de l'agent antimicrobien) après 6 semaines ;

- le taux de débourrement (après 14 jours) en fonction du traitement ;

Les formules suivantes ont servi au calcul des taux d'infection, de survie et de débourrement des bourgeons axillaires de couronne :

- Taux de d'infection (%) = Nombre d'explants infectés / Nombre total de tubesensemencés par traitement
- Taux de survie (%) = Nombre d'explants sains ayant connu un développement végétatif / Nombre total de tubesensemencés par traitement
- Taux de débourrement (%) = Nombre d'explants débourrés / Nombre total de tubesensemencés par traitement

Effet de la position et de l'âge : Les paramètres évalués sur le débourrement chez chaque cultivar sont la cinétique (sur 14 jours) et le taux de débourrement en fonction de la position et de l'âge après 14 jours de culture.

Analyse des données : Le dispositif adopté est un bloc complètement aléatoire. Pour l'effet des agents antimicrobiens, 27 traitements ont été testés. En effet, chaque traitement est constitué d'une dose de l'agent antimicrobien et du type de cultivar. Par rapport à l'influence de la position de l'explant (supérieure, médiane et basale) et de l'âge de l'infrutescence (8, 9 et 10 semaines), 9 traitements ont été considérés dans chaque cas. Ici, chaque traitement est formé d'une part de la position de l'explant en combinaison avec le type de cultivar et d'autre part de l'âge de l'infrutescence et du cultivar. Dix (10) tubes sont ensemencés par traitement avec trois (03) répétitions. Une régression logistique binaire a été réalisée pour estimer d'une part l'influence

des différentes doses d'agents antimicrobiens sur la survie des explants et d'autre part le comportement des différents types d'explant selon leur position et leur âge sur le débourrement. Une analyse descriptive (taux de débourrement, de survie et d'infection) a ensuite été faite. Pour l'analyse de la variabilité des moyennes des infections (fongiques et bactériennes) et de l'âge d'un traitement à un autre, une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs a été effectuée dans chaque cas suivie de la hiérarchisation des moyennes avec le test de Student Newman et Keuls au seuil de 5% (Dagnelie, 1980). Quant à celle de la variabilité des moyennes de la survie et du débourrement par rapport aux doses d'agents antimicrobiens d'une part et de la position d'autre part, la distribution des moyennes n'étant pas normale, le test de Kruskal-Wallis a été effectué. Des graphes ont été générés par le tableur Excel version 2010 et le logiciel STATISTICA version 6.31 a servi à l'analyse des différentes données.

RÉSULTATS

Effet des agents antimicrobiens sur les infections et la survie

Infections Fongiques : Le tableau 1 montre que le cultivar ($p= 0,000$) et la dose d'agent antimicrobien ($p=0,000$) ont une influence très hautement significative sur le comportement des explants. Cependant, l'interaction cultivar et dose d'agent antimicrobien n'est pas significative ($p=0,529$) montrant donc que l'effet du cultivar et celui de la dose d'agent antimicrobien peuvent

être étudiés séparément. Ainsi, pour les cultivars, Pain de sucre a présenté le plus fort taux d'infection fongique ($20,74\pm 2,82$) alors que Hilo a eu le plus faible taux d'infection fongique ($6,67\pm 1,69$). Quant aux doses d'agents antimicrobiens, le traitement témoin (N_0C_0) a présenté le plus fort taux d'infection fongique ($36,67\pm 3,73$) et le chlorothalonil à 0,3%, le plus faible taux ($0,00\pm 0,00$) (Tableau 2).

Tableau 1 : Résultat de la régression logistique binaire de l'effet des agents antimicrobiens sur les infections fongiques et bactériennes et la survie

		Degré de liberté	Log-	Chi ²	p
Infections fongiques	Ord. Orig.	1	-312,402		
	Cultivar/Morphotype	2	-300,212	24,38088	0,000 ***
	AntiMb. Dose	8	-251,801	96,82191	0,000 ***
	Cultivar/Morphotype*AntiMb. Dose	12	-246,304	10,99364	0,529 ns
Infections bactériennes	Ord. Orig.	1	-211,347		
	Cultivar/Morphotype	2	-200,821	21,05373	0,000 ***
	AntiMb. Dose	8	-177,841	45,95835	0,000 ***
	Cultivar/Morphotype*AntiMb. Dose	12	-173,696	8,28997	0,762 ns
Survie	Ord. Orig.	1	-506,092		
	Cultivar/Morphotype	2	-500,513	11,1586	0,003 **
	AntiMb. Dose	8	-318,800	363,4261	0,000 ***
	Cultivar/Morphotype*AntiMb. Dose	15	-305,181	27,2383	0,026 *

ns : non significatif ; * : significatif au seuil de 0,05 ; ** : hautement significatif au seuil de 0,05 ; *** : très hautement significatif au seuil de 0,05 ; P : probabilité au seuil de 0,05 ; AntiMb : Agents antimicrobiens.

Infections Bactériennes : Pour les infections bactériennes, le cultivar et la dose de l'agent antimicrobien ont chacun eu un effet très hautement significatif ($p=0,000$) sur la réussite de l'élimination des bactéries (Tableau 1). Mais l'interaction cultivar et dose

d'agent antimicrobien n'est pas significative ($p=0,762$). Ainsi, au niveau des cultivars, Pain de sucre a montré plus d'infection bactérienne ($12,59\pm 2,04$) et Hilo, le plus faible taux ($2,59\pm 0,85$). L'absence d'agent antimicrobien a favorisé l'apparition d'infection bactérienne

Badou et al., J. Appl. Biosci. 2018 Contrôle des germes endogènes par usage d'agents antimicrobiens et réponse de différents explants durant la phase d'initiation in vitro de l'ananas (*Ananas comosus* (L.))

(17,78±3,24) mais le chlorothalonil à 0,3% a empêché toute infection bactérienne (Tableau 2).

Survie : Les résultats ont montré que la survie des explants a varié d'un traitement à un autre. Le cultivar (p=0,003), la dose de l'agent antimicrobien (p=0,000) et leur interaction (p=0,026) ont un effet significatif sur la

survie (Tableau 1). L'interaction étant significative, le cultivar Pain de sucre sur le milieu témoin, sans agent antimicrobien, a présenté le plus faible taux de survie (10,00±0,00) alors que St Michael sur le milieu renfermant de l'hypochlorite à 0,3% a donné le taux de survie le plus élevé (76,67±3,33) (Tableau 2).

Tableau 2 : Taux d'infections fongique et bactérienne et de Survie en fonction des traitements

Nature et Dose des Agents antimicrobiens	Cultivars	Taux d'infection fongique	Taux d'infection bactérienne	Taux de survie
N ₀ C ₀	S. Cay/St M.	40,00±0,00 b	13,33±3,33 a	30,00±0,00 b
	S. Cay/Hilo	23,33±3,33 a	10,00±0,00 a	60,00±0,00 c
	Pain de sucre	46,67±3,33 b	30,00±0,00 b	10,00±0,00 a
	Moyenne	36,67±3,73 D	17,78±3,24 C	33,33±7,26 C
	p	0,002 **	0,001 ***	0,018 *
N _{0,1} C ₀	S. Cay/St M.	26,67±3,33 ab	13,33±3,33 ab	50,00±0,00 b
	S. Cay/Hilo	16,67±3,33 a	3,33±3,33 a	73,33±3,33 c
	Pain de sucre	36,67±3,33 b	23,33±3,33 b	26,67±3,33 a
	Moyenne	26,67±3,33 C	13,33±3,33 BC	50,00±6,87 D
	p	0,016 *	0,016 **	0,000 ***
N _{0,2} C ₀	S. Cay/St M.	13,33±3,33 a	6,67±3,33 b	70,00±5,77 b
	S. Cay/Hilo	10,00±0,00 a	0,00±0,00 a	70,00±0,00 b
	Pain de sucre	26,67±3,33 b	20,00±0,00 c	43,33±3,33 a
	Moyenne	16,67±2,89 B	8,89±3,09 B	61,11±4,84 DE
	p	0,011 *	0,001 ***	0,004 **
N _{0,3} C ₀	S. Cay/St M.	10,00±0,00 b	3,33±3,33 a	76,67±3,33 b
	S. Cay/Hilo	3,33±3,33 a	0,00±0,00 a	73,33±3,33 b
	Pain de sucre	20,00±0,00 c	13,33±3,33 b	60,00±0,00 a
	Moyenne	11,11±2,61 AB	5,56±2,42 AB	70,00±2,89 E
	p	0,003 **	0,031 *	0,011 *
N _{0,4} C ₀	S. Cay/St M.	6,67±3,33 a	0,00±0,00 a	63,33±3,33 a
	S. Cay/Hilo	3,33±3,33 a	0,00±0,00 a	56,67±3,33 a
	Pain de sucre	10,00±0,00 a	3,33±3,33 a	63,33±3,33 a
	Moyenne	06,67±1,67 AB	1,11±1,11 A	61,11±2,00 DE
	p	0,296 ns	0,422 ns	0,332 ns
N ₀ C _{0,075}	S. Cay/St M.	6,67±3,33 a	10,00±0,00 a	10,00±0,00 a
	S. Cay/Hilo	3,33±3,33 a	6,67±3,33 a	3,33±3,33 a
	Pain de sucre	23,33±3,33 b	13,33±3,33 a	13,33±3,33 a
	Moyenne	11,11±3,51 AB	10,00±1,67 B	8,89±2,00 B
	p	0,011 *	0,296 ns	0,098 ns
N ₀ C _{0,15}	S. Cay/St M.	0,00±0,00 a	6,67±3,33 a	0,00±0,00 a
	S. Cay/Hilo	0,00±0,00 a	3,33±3,33 a	0,00±0,00 a
	Pain de sucre	16,67±3,33 b	6,67±3,33 a	3,33±3,33 a
	Moyenne	5,56±2,94 A	5,56±1,76 AB	1,11±1,11 A
	p	0,001 ***	0,729 ns	0,422 ns
N ₀ C _{0,225}	S. Cay/St M.	0,00±0,00 a	3,33±3,33 a	0,00±0,00 a
	S. Cay/Hilo	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	Pain de sucre	6,67±3,33 a	3,33±3,33 a	0,00±0,00 a
	Moyenne	2,22±1,47 A	2,22±1,47 A	0,00±0,00 A
	p	0,079 ns	0,565 ns	1 ns
N ₀ C _{0,3}	S. Cay/St M.	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	S. Cay/Hilo	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	Pain de sucre	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	Moyenne	0,00±0,00 A	0,00±0,00 A	0,00±0,00 A
	p	1 ns	1 ns	1 ns
P		0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***
Cultivars	S. Cay/St M.	11,48±2,60 A	6,30±1,21 B	33,33±5,99 A
	S. Cay/Hilo	06,67±1,69 A	2,59±0,85 A	37,41±6,53 A
	Pain de sucre	20,74±2,82 B	12,59±2,04 C	24,44±4,72 A
P		0,000 ***	0,000 ***	0,465 ns

S. Cay : Smooth Cayenne ; St M. : St Michael ; ns : non significatif ; ** : hautement significatif au seuil de 0,05 ; *** : très hautement significatif au seuil de 0,05 ; p : probabilité au seuil de 0,05 ; Moy. : Moyenne . Moyennes d'une même colonne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% par le test de Student Newman and Keuls (SNK).

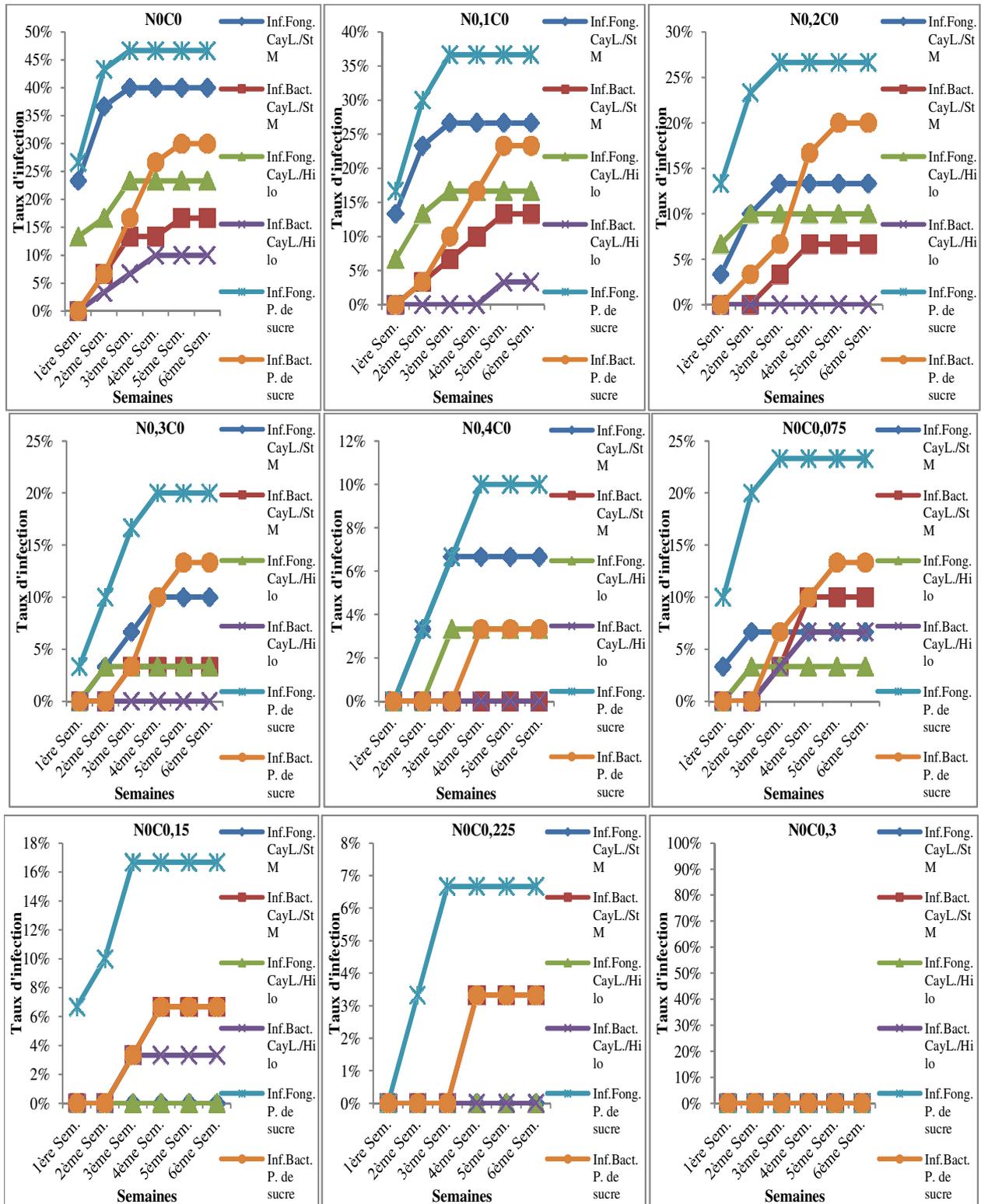


Figure 2 : Cinétique des infections en fonction de la dose de l'agent antimicrobien chez St Michael

La figure 2 révèle chez tous les cultivars que les infections fongiques apparaissent généralement dès la première semaine avec une prédominance des apparitions respectivement chez Pain de sucre, St Michael et Hilo. Néanmoins, aux fortes concentrations d'agent antimicrobien, l'apparition des infections est devenue tardive, passant à la deuxième semaine. Ainsi, si pour le témoin sans agent antimicrobien, les taux d'infection fongique à la première semaine étaient de 26,67%, 23,33% et 13,33% respectivement pour Pain de

sucré, St Michael et Hilo, avec l'hypochlorite de sodium à 0,4%, ces infections n'apparaissent qu'au deuxième jour voire troisième pour Hilo. Quant aux infections bactériennes, elles ne s'observent surtout qu'à partir de la deuxième semaine et leur apparition devient de plus en plus tardive au fur et à mesure que la concentration en agent antimicrobien augmente allant jusqu'à la quatrième semaine avec l'hypochlorite de sodium à 0,4%. On note l'élimination complète de tout type d'infection avec le chlorothalonil à 0,3%.

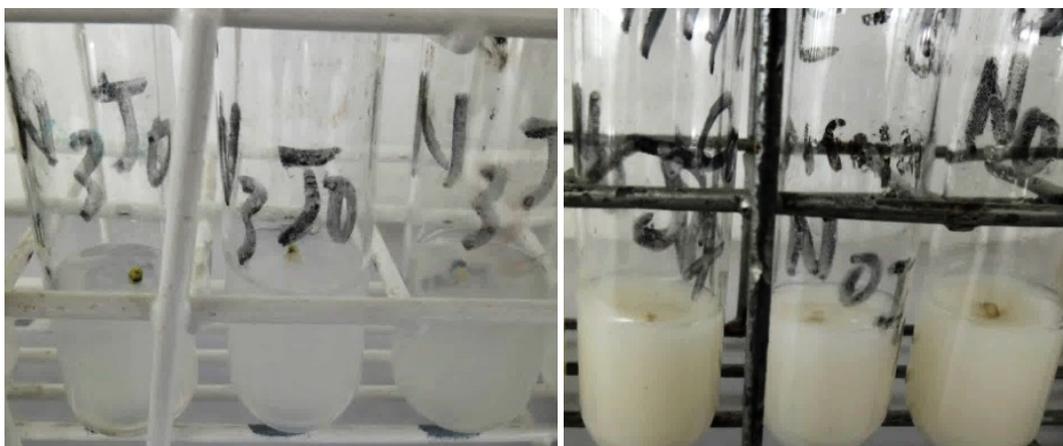


Figure 3 : Bourgeons de Hilo après 14 jours (a) sur $N_{0,3}C_0$; (b) sur $N_0C_{0,075}$

Les champignons sont les principaux germes responsables des infections dont les principaux sont des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma* et *Cladosporium*. D'autres champignons, non identifiés, des levures et des bactéries ont également été observés.

Effet des agents antimicrobiens sur le débourrement :

Le tableau 3 révèle une différence très hautement significative ($p = 0,000$) du débourrement *in vitro* des bourgeons axillaires en fonction des agents antimicrobiens. Mais le cultivar ($p=0,537$) et l'interaction cultivar et dose d'agent antimicrobien ($p=0,997$) n'ont pas montré de différence significative quant à leur effet sur le débourrement. L'analyse de la variance a révélé une différence très hautement significative respectivement pour le cultivar ($p=0,000$) et la dose d'agent antimicrobien ($p=0,000$) mais leur interaction n'est pas significative ($p=0,421$). Ainsi, les cultivars ont présenté des moyennes de $41,85 \pm 7,36$; $45,56 \pm 7,72$ et $46,30 \pm 7,53$ respectivement pour Hilo, St Michael et Pain de sucre (Figure 4a). Concernant les agents antimicrobiens, leur

absence a donné le plus fort taux de débourrement ($88,89 \pm 2,00$) alors que le chlorothalonil à partir de 0,225% a empêché tout débourrement ($0,00 \pm 0,00$) (Figure 4b). L'ajout des agents antimicrobiens et surtout du chlorothalonil a eu un effet négatif significatif sur le débourrement qui s'est accentué avec l'augmentation de leur concentration. Cinq groupes homogènes à $\alpha=0,05$ se dégagent en fonction de l'effet des agents antimicrobiens : le groupe 1 formé du traitement témoin avec un taux de 88,89% ; le groupe 2 formé des traitements à base d'hypochlorite de sodium à 0,1%, 0,2% et 0,3% avec des taux compris entre 78,89% et 82,22% ; le groupe 3 uniquement formé de l'hypochlorite de sodium à 0,4% avec un taux de 62,22% ; le groupe 4 seulement constitué du chlorothalonil à 0,075% avec un taux de 8,89 et enfin le groupe 5 constitué des traitements à base de chlorothalonil à 0,15%, 0,225% et 0,3% avec des taux compris entre 0% et 1,11% (figure 4b). L'interaction agent antimicrobien et cultivar n'est pas significative indiquant alors que l'effet des différentes doses d'agent antimicrobien n'est pas fonction du cultivar.

Tableau 3 : Résultat de la régression logistique binaire de l'effet des agents antimicrobiens sur le débourrement

	Degré de liberté	Log-	Chi ²	p
Ord. Orig.	1	-556,660		
Cultivar/Morphotype	2	-556,038	1,2421	0,537 ns
AntiMb. Dose	8	-256,945	598,1864	0,000 ***
Cultivar/Morphotype* AntiMb. Dose	15	-254,946	3,9983	0,997 ns

ns : non significatif ; *** : très hautement significatif au seuil de 0,05 ; P : probabilité au seuil de 0,05 ; AntiMb : Agents antimicrobiens

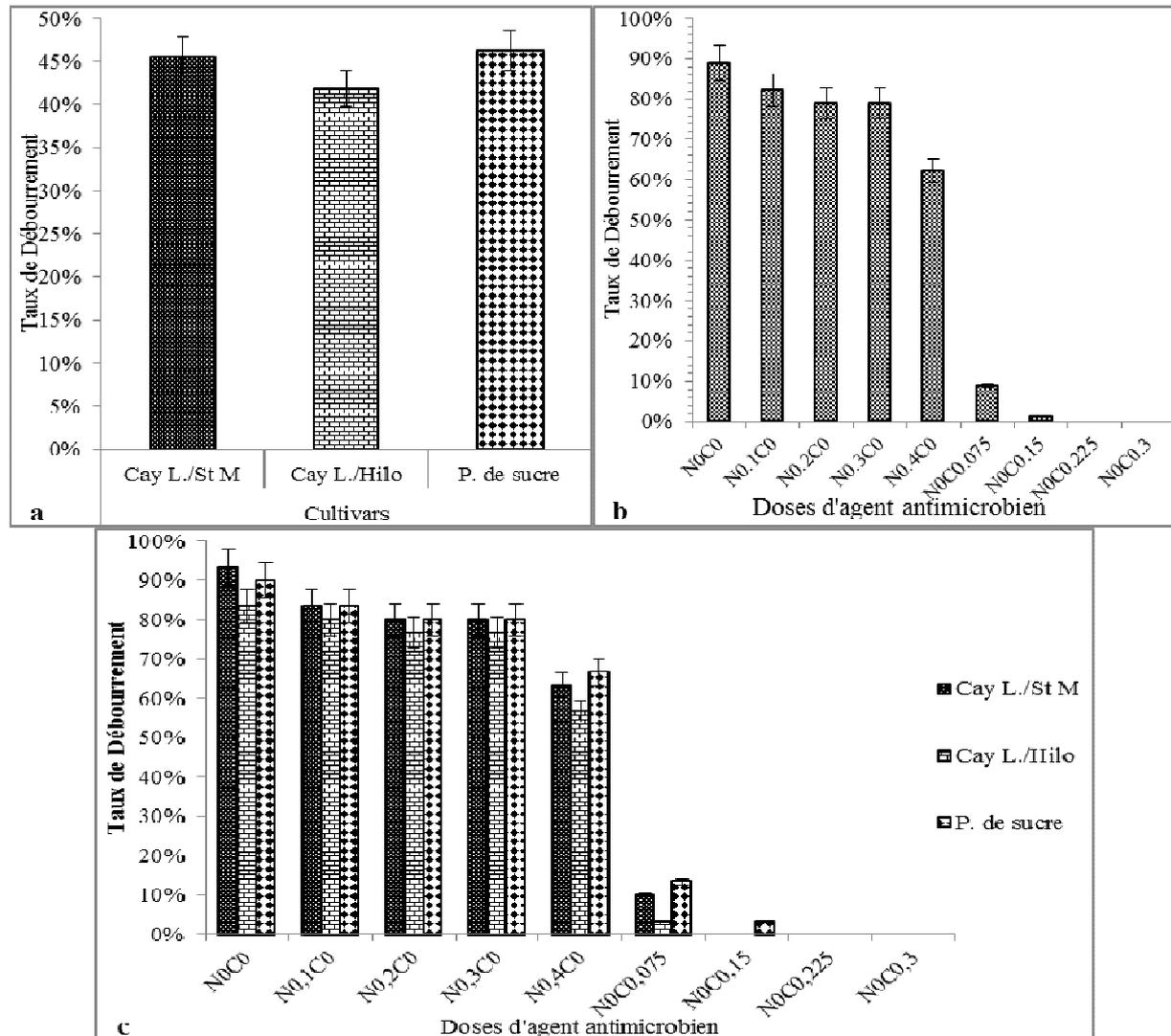


Figure 4 : Taux de Débourrement des bourgeons (a) : en fonction du cultivar ; (b) : en fonction de la concentration de l'agent antimicrobien et (c) : en fonction du traitement

Effet de la position et de l'âge de l'explant sur le débourrement : L'analyse du tableau 4A montre que la position a significativement influencé le débourrement ($p=0,000$) mais le cultivar ($p=0,725$) et son interaction ($p=0,089$) avec la position n'ont pas d'effet significatif sur le débourrement. Les bourgeons de la partie supérieure

ont présenté chez tous les cultivars une meilleure aptitude au débourrement avec un taux moyen de 86,67% contre 78,89% et 11,11% respectivement pour les bourgeons des parties médiane et basale (Figure 5a). L'analyse de la variance a révélé une différence très hautement significative ($p=0,000$) entre les positions de

même que pour l'interaction entre la position et le cultivar. Quant au cultivar, la différence n'est pas significative ($p=0,052$). L'analyse de la figure 6a montrant la cinétique du débourrement en fonction de la position révèle que les bourgeons de la partie supérieure indépendamment du cultivar commencent par débourrer le 9^{ème} jour avec des taux de 50% pour St Michael et Pain de sucre et 46,67% pour Hilo ; le maximum de débourrement est atteint au 11^{ème} jour. Quant aux bourgeons médians, ils débourrent à partir du 10^{ème} jour avec des taux de 50%, 40% et 73,33% respectivement pour St Michael, Hilo et Pain de sucre et tous les bourgeons débourrés sont obtenus au 12^{ème} jour. Enfin, les bourgeons basaux ne commencent à débourrer qu'au 12^{ème} jour voire 13^{ème} pour Hilo et tous les bourgeons débourrés sont obtenus au 14^{ème} jour. L'effet de l'âge des bourgeons sur le débourrement s'est révélé significatif ($p=0,034$) mais ici encore le cultivar

(0,887) et son interaction avec l'âge (0,985) n'ont pas montré de différence significative sur le débourrement (tableau 4B). Les bourgeons âgés de 8 semaines (92,22%) ont été plus favorables au débourrement chez les trois cultivars que ceux âgés de 9 (84,44%) et 10 semaines (78,89%) (Figure 5b). Pour la cinétique du débourrement en fonction de l'âge (Figure 6b), on constate que les bourgeons de 8 et 9 semaines commencent le débourrement chez tous les cultivars le 9^{ème} jour mais on note plus de bourgeons de 8 semaines débourrés au 9^{ème} jour que ceux de 9 semaines. Les derniers bourgeons de 8 et 9 semaines débourrent déjà au 11^{ème} jour mais avec plus de bourgeons âgés de 9 semaines débourrés au 11^{ème} jour. Quant aux bourgeons âgés de 10 semaines, le débourrement ne commence qu'au 10^{ème} jour après ensemencement et tous les bourgeons débourrés sont obtenus au 12^{ème} jour.

Tableau 4 : Régression logistique binaire de l'influence de la position (A) et de l'âge (B) sur le débourrement

Tableaux	Facteurs	ddl	Log-	Chi ²	p	
A	Effet de la position	Ord. Orig.	1	-182,860		
		Cultivar/Morpho	2	-182,540	0,6407	0,725 ns
		Position	2	-112,515	140,0492	0,000 ***
		Cultivar/Morpho*Position	4	-108,493	8,0448	0,089 ns
B	Effet de l'âge	Ord. Orig.	1	-113,261		
		Cultivar/Morpho	2	-113,141	0,238280	0,887 ns
		Age	2	-109,764	6,754071	0,034 *
		Cultivar/Morpho*Age	4	-109,585	0,359616	0,985 ns

ns : non significatif ; * : significatif au seuil de 0,05 ; *** : très hautement significatif au seuil de 0,05 ; p : probabilité au seuil de 0,05 ; ddl : degré de liberté.

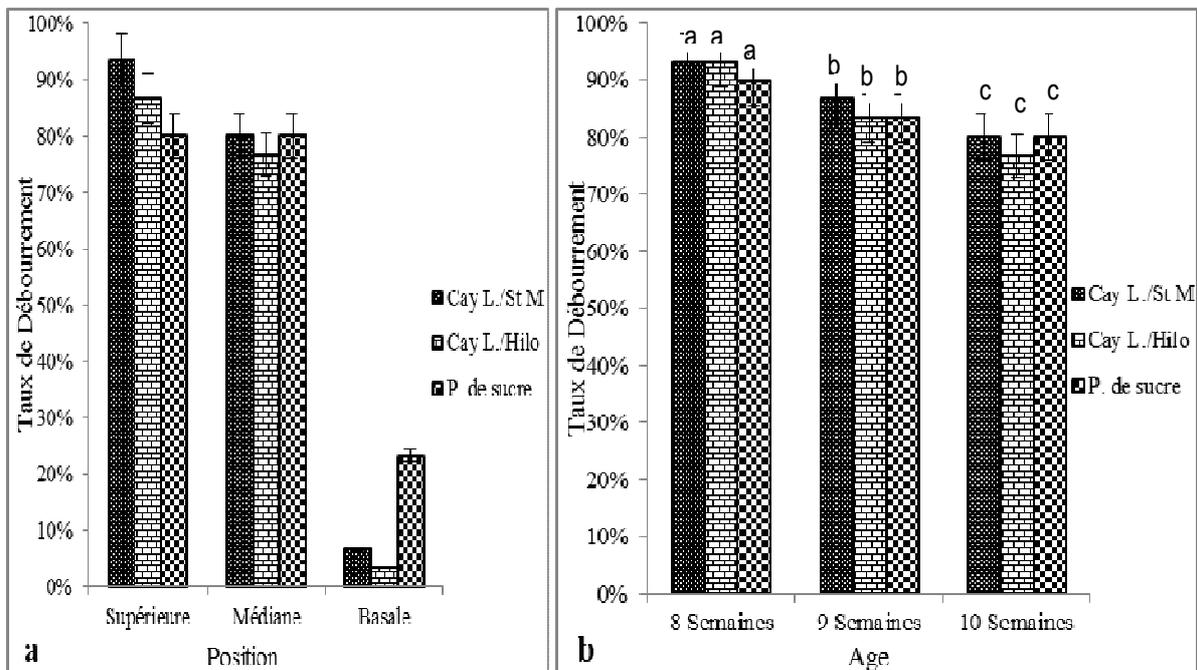


Figure 5 : Évaluation de l'effet de la position (a) et de l'âge (b) sur le débourrement

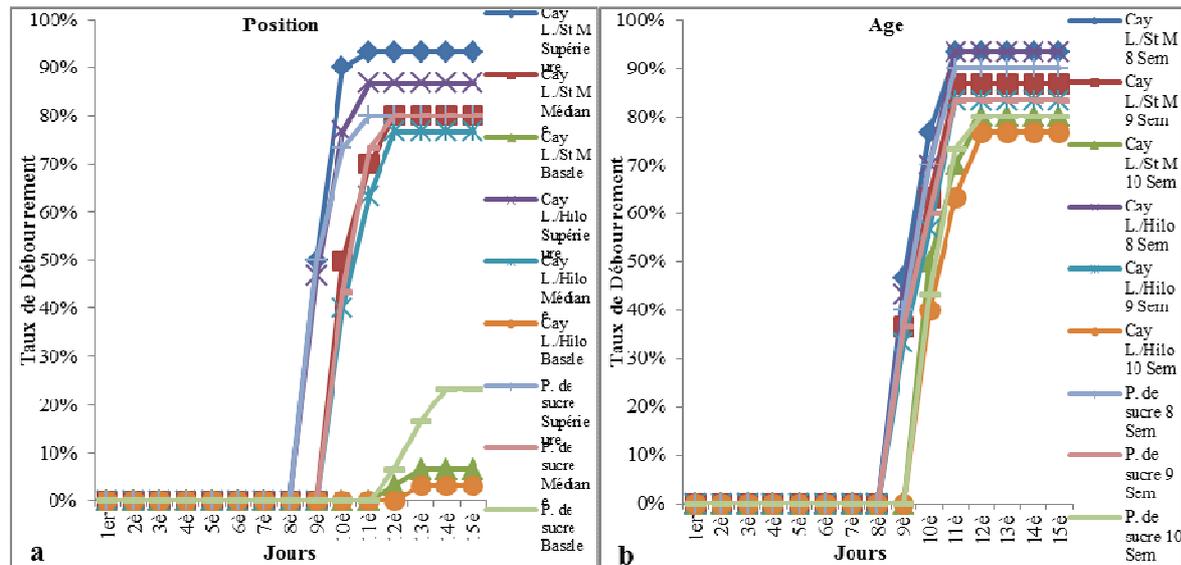


Figure 6 : Cinétique du débourrement en fonction de la position(a) et de l'âge(b)

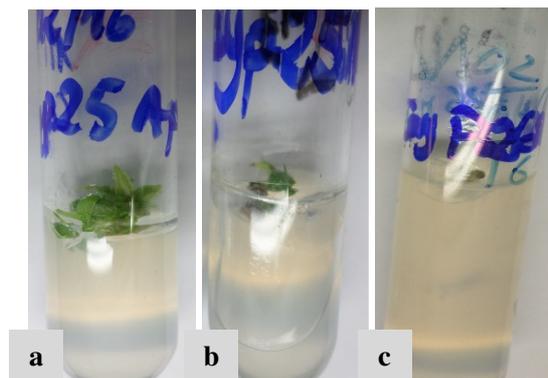


Figure 7 : Bourgeons supérieur (a), médian (b) et basal (c) débourrés de St Michael après 8 semaines sur le milieu MS+BAP 5 mg/l

DISCUSSION

L'objectif de la présente étude a été de réduire les infections surtout celles endogènes à l'explant par l'introduction d'agents antimicrobiens (Hypochlorite de sodium et Chlorothalonil) dans le milieu de culture sans entraver la reprise et d'évaluer l'effet de la position des bourgeons axillaires de couronne et de l'âge des fruits sur la reprise *in vitro* chez l'ananas. Le premier aspect de cette étude qu'est la maîtrise des infections a montré que la désinfection de surface habituellement faite lors de la culture *in vitro* ne permet pas d'éliminer efficacement les infections surtout celles bactériennes qui, sont endogènes et apparaissent progressivement au cours de la culture. En effet, l'absence d'agent antimicrobien dans le milieu de culture a favorisé l'apparition de tous les types d'infection tout en n'entravant pas le débourrement des

bourgeons. Au contraire, l'introduction de fortes doses d'agents antimicrobiens bien qu'en réduisant les infections a limité l'aptitude au débourrement surtout avec le chlorothalonil. Ce dernier s'est donc montré très toxique pour les tissus même à 0,075%. Bendahmane *et al.* (1992) ont montré que le chlorothalonil agit plus au début du cycle de développement (germination) des champignons qu'au niveau de la croissance. Ceci justifie alors la forte élimination des infections car il empêche leur déclenchement. Il a déjà été relevé que certains agents antimicrobiens se comportent comme des régulateurs de la morphogenèse en réduisant la reprise *in vitro* (Costa *et al.*, 2000; Danilova et Dolgikh, 2004). Les travaux de Hounguè *et al.* (2017) ont montré chez *Manihot esculenta* Crantz que le chlorothalonil à 0,2% réduit

significativement les infections mais aussi le nombre de nœuds formés par les plantules. De même, Acheampong et al. (2015) se basant uniquement sur la désinfection de surface ont noté chez le cultivar Sugarloaf une réduction de la régénération au fur et à mesure que la concentration du désinfectant augmentait, les deux étant donc inversement proportionnelles. Les meilleurs résultats permettant à la fois une réduction des infections et un meilleur débourrement ont été obtenus avec l'hypochlorite de sodium qui a permis à 0,3% un taux de débourrement de 78,89% contre seulement 17,78% d'infection, la survie étant de 70%. L'hypochlorite de sodium, de sa double action antifongique et antibactérienne, a donc fortement réduit les infections aussi bien fongiques que bactériennes. Les infections bactériennes ont été plus tardives dans leur apparition au cours de la culture révélant qu'elles seraient endogènes. En effet, nos travaux ont révélé qu'elles apparaissent au plus tôt à la 2^{ème} semaine et parfois à la 4^{ème} semaine. Par contre, les infections fongiques apparaissent déjà à la 1^{ère} semaine. Les infections endogènes surtout bactériennes chez l'ananas ont déjà été relevées lors des travaux de Badou et al. (2017) surtout chez le cultivar Pain de sucre à cause de sa forte teneur en sucre. La même tendance a également été notée au cours des présents travaux où Pain de sucre a présenté de forts taux d'infections (fongiques, bactériennes et mixtes) et s'est donc montré difficile à désinfecter. En effet, bien que présentant en général le meilleur taux de débourrement (46,30%) contre 45,55% et 41,85% respectivement pour St Michael et Hilo, Pain de sucre a eu du fait des infections le plus faible taux de survie (24,44%) par rapport à St Michael (33,33%) et Hilo (37,41%). L'essentiel des germes rencontrés lors des présents travaux a déjà été relevé lors des travaux de Acheampong et al. (2015) sur l'initiation de bourgeons axillaires de feuilles de cayeux d'ananas. La reprise *in vitro* a été influencée par des facteurs intrinsèques à l'explant tels que la nature et l'âge de l'explant utilisé. L'étude de l'effet du type d'explant sur la régénération a révélé que chez tous les cultivars, les bourgeons de la partie supérieure (86,67%) présentent une meilleure aptitude au débourrement par rapport aux bourgeons médians (78,89%) et basaux (11,11%) montrant alors que le comportement des explants dépend plus de leur position sur l'axe de la couronne ($p=0,000$) que du cultivar ($p=0,725$). Le taux de débourrement a donc augmenté de la base vers le sommet de la couronne. Aussi, l'âge des bourgeons médians a significativement influencé leur comportement par rapport au débourrement ($p=0,034$). Les bourgeons médians âgés de 8 semaines

ont présenté une meilleure réactivité chez tous les cultivars par rapport à ceux de 9 et 10 semaines avec respectivement des taux de reprise de 92,22% ; 84,44% et 78,89%. Or, dans la biologie de l'ananas, l'apparition des bourgeons sur la couronne est acropète comme celle de la floraison sur l'infrutescence et du murissement (Bartholomew et al., 2010 ; Teisson, 1973). De ce fait, l'aptitude au débourrement notée au niveau des bourgeons de la partie supérieure pourrait se justifier par leur jeune âge puisque sur une même couronne, ils apparaissent en dernière position. L'effet de la position rejoint donc celui de l'âge. Ainsi, il se dégage que plus les bourgeons sont jeunes, plus ils présentent une plus forte aptitude à débourrer. Cela pourrait se justifier par l'état physiologique ou stade de développement de ces bourgeons de la partie supérieure où la multiplication cellulaire est encore accrue car en pleine mise en place. Buvat (1955) a montré que la fréquence des divisions cellulaires décroît au fur et à mesure qu'on s'éloigne du méristème apical du fait des temps de latence entre divisions permettant ainsi l'exécution du programme génétique dans la différenciation. En effet, plus les bourgeons sont âgés (position ou semaines après floraison), plus ils présentent une différenciation plus poussée donc plus de difficulté à faire une dédifférenciation avant la différenciation. Une différenciation en racine est même parfois perceptible chez des bourgeons basaux. La position et l'âge déterminent donc significativement chez tous les cultivars le comportement des bourgeons. De pareilles observations ont été faites par Basto et al. (2012) sur *Cedrela montana* où les explants (bourgeons, nœuds, feuilles, pétiole et entre-nœuds) provenant de plants âgés avaient plus de mal à régénérer *in vitro* par rapport aux explants provenant de plants jeunes. Concernant l'effet de la position, Acheampong et al. (2015) ont fait de similaires observations sur les bourgeons de cayeux de tige d'ananas, où les bourgeons apicaux et médians ont respectivement présenté des taux de régénération de 95% et 90% par rapport aux bourgeons basaux qui ont eu un taux de régénération de 65%. Gitonga et al. (2010) ont montré chez *Macadamia* spp. que les fragments nodaux des 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} positions à partir de l'apex ont présenté une meilleure reprise *in vitro* par rapport à ceux des 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} positions. De même, les travaux de Houédjissin et al. (2015) ont révélé chez *Pentadesma butyracea* Sabine que les fragments de tige à bourgeon apical présentaient une meilleure réponse *in vitro* par rapport aux fragments de tige à bourgeon axillaire révélant ainsi que la régénération de l'explant dépend de sa position sur la tige. Des présents travaux, on note que

les bourgeons de la partie supérieure non seulement ont donné le meilleur taux de reprise *in vitro* mais ont débouffé plus vite que les autres (9-11 jours). Tous les

bourgeons de la couronne ne sont donc pas favorables à la culture *in vitro* de l'ananas.

CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent que la désinfection de surface généralement effectuée au cours de l'initiation ne permet pas d'éliminer efficacement les infections fongiques et bactériennes chez l'ananas. L'introduction d'agent antimicrobien dans le milieu de culture a réduit les infections mais a eu effet négatif sur le débouffement au fur et à mesure que la concentration de l'agent antimicrobien augmente. Néanmoins, l'hypochlorite de sodium à 0,3% a permis une élimination des infections sans affecter significativement la reprise des bourgeons. Il peut donc être utilisé pour l'initiation des différents cultivars d'ananas. Le chlorothalonil s'est révélé très

toxique pour les explants même à 0,075%. Le comportement des bourgeons des différents cultivars a été influencé par l'état physiologique des bourgeons (âge après floraison et position des bourgeons sur l'axe de la couronne). Les bourgeons supérieurs d'une part et médians de 8 semaines d'autre part ont tous favorisé la reprise de l'ananas. L'utilisation des bourgeons axillaires des parties supérieure et médiane de couronne âgée surtout de 8 semaines après floraison est donc souhaitée pour optimiser les taux de reprise lors de l'initiation des différents cultivars d'ananas.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Bénin qui a octroyé une bourse d'étude pour faciliter le déroulement du travail ; Dr Arnaud Agbidinokoun et Dr Gilles CACAÏ qui ont corrigé ce papier ; Dr Aimé AYENA

(Microbiologiste) qui nous a aidés dans l'identification des germes ; les docteurs, doctorants et techniciens du Département de Génétique et des Biotechnologies qui nous ont aidés au cours des manipulations et dans la correction du document.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acheampong S, Galyuon IKA, Asare AT, 2015. Effects of sterilization protocols, benzylaminopurine and type of explants on growth initiation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultures. Journal of Basic & Applied Sciences 1 (3) : 50-65.
- Almeida WAB De, Santana GS, Rodriguez APM, Carvalho Costa MAP De, 2002. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP 24(2): 296-300.
- Badou BT, Agbidinokoun A, Nondichao L, Dossoukpèvi R, Cacaï GTH, Houédjissin SS, Ahanhanzo C, 2017. Effects of two disinfectants and two growth regulators on *in vitro* propagation of Smooth Cayenne and Sugarloaf cultivars of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Mill var. *comosus*). Journal of Biotechnology Research 3 (10) : 94-105.
- Bartholomew DP, Coppens d'Eeckenbrugge G, Chen C-C, 2010. Register of New Fruit and Nut Cultivar List 45. HortScience 45(5) : 740-742.
- Basto S, Serrano C, Hodson de Jaramillo E, 2012. Effects of donor plant age and explants on *in vitro* culture of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. Univ. Sci. 17(3) : 263-271.
- Bendahmane B, Barrault G, Albertini L, Toubia-Rahme H, 1992. Étude de l'action *in vitro* de divers fongicides sur le développement de *Drechslera teres f. teres* et *f. maculata*. Phytopathologia Mediterranea 31(2) : 77-84.
- Bioforma-Cahier de formation, 2002. Les moisissures d'intérêt médical. CHU d'Angers. N°25 p159.
- Buvat R, 1955. Le méristème apical de la tige. Ann Bio ! 31: 596-656. Cell Rep. 14 525-528.
- Costa MGC, Nogueira FTS, Figueira ML, Otoni WC, Brommoschenkel SH, Cecon PR, 2000. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. Plant Cell Reports 19 : 327-332.
- Dagnelie P, 1980. Théorie et méthodes statistiques. II. Applications agronomiques. Gembloux, Belgique : Les Presses agronomiques de Gembloux, 463 p.
- Danilova SA and Dolgikh YI, 2004. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. Russian Journal of Plant Physiology (51) : 559-562.
- Danso KE, Ayeh KO, Oduro V, Amiteye S, Amoatey HM, 2008. Effect of 6-Benzylaminopurine and α -

- Naphthalene Acetic Acid on *In vitro* Production of MD2 Pineapple Planting Materials. World Applied Sciences Journal 3 (4) : 614-619.
- Das SC, Das A, Suresh CP, Prakash J, Bhattacharjee T, 2010. Pineapple cultivation in Hilly Tripura with Year round production : Improving Livelihood Opportunities in Rural Areas of Tripura. Addendum to Newsletter Pineapple Working Group, International society for Horticultural Science, Issue No. 17
- Daud NH, Jayaraman S and Mohamed R, 2012. Methods Paper : An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. As. Pac. J. Mol. Biol. & Biotech. 2 : 55- 58.
- Dossoukpèvi R, Ahanhanzo C, Adoukonou-Sagbadja H, Cacaï G, Naitchede H, Agbangla C, 2012. Contribution à l'amélioration de la production *in vitro* de deux espèces d'*Ocimum* spp (Lamiaceae) : *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* cultivées au Bénin Int. J. Biol. Chem. Sci. 6(6) : 4046-4057.
- Gitonga LN, Gichuki ST, Ngamau K, Muigai AWT, Kahangi EM, Wasilwa LA, Wepukhulu S, Njogu N, 2010. Effect of explant type, source and genotype on *in vitro* shoot regeneration in Macadamia (*Macadamia* spp.) Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development 2(7) : 129-135.
- Gnimadi A, 2008. Étude pour l'identification des filières agroindustrielles prioritaires (Bénin). Programme de Restructuration et de Mise à Niveau de l'Industrie des États membres de l'UEMOA - (PRMN).
- Houédjissin SS, Dangou SJ, Azokpota P, Cacaï G, Agbidinoukoun A, Hounhouigan DJ, Ahanhanzo C, 2015. Régénération *in vitro* de l'arbre à suif (*Pentadesma butyracea* sabine), une espèce ligneuse à usages multiples (Lum) vulnérable au Bénin. European Scientific Journal 11(21) : 150-167
- Hounguè JA, Cacaï GHT, Zandjanakou-Tachin M, Azalou-Tingbé NC, Ahanhanzo C, 2017. Impact of Thermoherapy And Chlorothalonil On Plantlets Production Of Some Genotypes Of Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) Produce In Benin. International Journal of Scientific & Technology Research 6 (1) : 170-174.
- Ibrahim MA, Al-Taha HA, Seheem AA, 2013. Effect of cytokinin type and concentration, and source of explant on shoot multiplication of pineapple plant (*Ananas comosus* 'Queen') *in vitro*. Acta agriculturae Slovenica 101(1) : 15-20.
- Leifert C, Morris C, Waites WM, 1994. Ecology of microbial saprophytes and Pathogens in field grown and tissue cultured plants. CRC Critical reviews plant science 13 :139-183.
- Leifert C, Waites WM & Nicholas JR, 1989. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. Journal of Applied Bacteriology 67 : 353-361.
- Lopez-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, Lopez-Navidad I, Barcelo-Muñoz M, 1994. Micropropagation of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. J. Hortic. Sci. 625-637.
- Murashige T. and Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15 :473-497.
- Omokolo ND, Fotso, Tita MA, Niemenak N, 2001. Régénération directe *in vitro* de l'*Ananas comosus* (L.) Merrill var. Cayenne à partir de couronnes cultivées en milieu liquide. Fruits 56 (6) : 415-421.
- Pannetier C. et Lanaud C, 1976. Divers aspects de l'utilisation possible des cultures « *in vitro* » pour la multiplication végétative de l'*Ananas comosus* L. Merr, variété 'cayenne lisse'. Fruits 31(12) : 739-750.
- Phillips R, Arnott SM, Kaplan SE, 1981. Antibiotics in plant tissue culture : Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. Plant Sci. Lett. 21(3): 235-240.
- Pierik RLM, 1987. Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. - In Debergh (P.C.), Zimmerman (R.H.) Micropropagation. Technology and application. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers p 155-165.
- Reddy SH, Chakravarthi M, Chandrashekara KN, Naidu CV, 2012. Influence of Bavistin and Silver Thiosulphate on *in Vitro* Regeneration of *Asclepias curassavica* (L.) Using Nodal Explants. American Journal of Plant Sciences 3 : 941-946.
- Rodrigues DT, Novais RF, Venegas VHA, Dias JMM, Otoni WC, Villani EM de A, 2013. Chemical

- sterilization in *in vitro* propagation of *Arundina bambusifolia* Lindl. and *Epidendrum ibaguense* Kunth. Rev. Ceres, Viçosa 60(4) : 447-451.
- Silva TCY De, Fernando KMEP, Senerath WTPSK, 2011. Effect of incorporation of fungicides into tissue culture medium on fungal contaminants of *in vitro* grown *Kaempferia galanga*. University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda, Sri-Lanka
- Talukder MI, Begum F, Azad MMK, 2007. Management of pineapple disease of sugarcane through biological means. J. Agric. Rural Dev. 5(1-2) : 79-83.
- Teisson C., 1973. Développement et croissance de l'inflorescence d'*Ananas comosus* (cv Cayenne lisse). Fruits 28 (6) : 433-439.
- Ummey H, Sharmin R, Mihir LS, Khan MR, Syed H, 2002. Endogenous Bacterial Contamination During *In vitro* Culture of Table Banana : Identification and Prevention. Plant Tissue Cult. 12(2) : 117-124.
- Usman IS, Abdulmalik MM, Sani LA, Muhammad AN, 2013. Development of an efficient protocol for micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. var. smooth cayenne) African Journal of Agricultural Research 8(18): 2053-2056.
- Zuraida AR, Nurul SAH, Harteeni A, Roowi S, Che Radziah CMZ, Sreeramanan S, 2011. A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system. African Journal of Biotechnology 10(19) : 3859-3866.