



Edition 2017

# ALGERIE: Production de plants de fraises *in-vitro*.



Production de fraises sous serres



Production de plants de fraisiers (Ciref.fr)



Micro-propagation in vitro



Chambre de culture in vitro

« La culture in vitro est à la fois un métier très artisanal mais aussi hautement technologique ». Ciref.fr.

**Djamel BELAID.**

مهندس زراعي

## INTRODUCTION

# Comment produire des plants?

## Plants de fraisiers, une technologie de pointe.

---

### Production de plants de fraisiers DZ.

Cette activité nécessite un personnel de laboratoire maîtrisant les technologies des cultures in vitro.

Pour chaque espèce et pour chaque variétés les milieux de cultures sont différents. Quelques micro-grammes d'hormones suffisent à faire échouer la culture au laboratoire.

Les compositions des milieux de culture sont jalousement gardés secret par les laboratoires. Mais la base de travail peut être trouvée dans des articles scientifiques que l'on trouve sur internet.

### CONSEILS

#### Pour un investisseur qui possède des moyens :

- recruter un ingénieur spécialisé en culture in vitro sur la fraise
- l'envoyer en stage à l'étranger
- l'entourer de techniciens de laboratoire en culture in vitro.
- pour assurer une rentabilité, ne pas se contenter de la production de plants de fraisiers mais assurer une production de plants qui rapporte du cash (roses, pomme de terre, palmiers, ...).

Nos universités regorgent de spécialistes en culture in vitro.

### ZOOM

Documentation importante sur le site Ciref.fr.

Nous publions dans cette brochure des extraits d'un article indiquant la composition des milieux de culture : <http://www.socpharmbordeaux.asso.fr/pdf/pdf-138/138-019-048.pdf>

Cet article date, il s'agit de trouver plus récent, mais il donne les bases.

Par exemple, le simple changement de type de contenant de culture génère aux plants un aspect complètement différent.

# Les bases de la culture in vitro (I)

## Une technique sophistiquée de laboratoire.

### Le défi de la recherche et du développement en culture in vitro

08. septembre, 2015 | Publié par Isabelle Ciref.fr

La culture in vitro est une technique bien établie dans la production de plants pour l'agriculture française car elle offre de nombreux avantages comme la capacité de multiplier n'importe quelle espèce et la production rapide d'un grand nombre de plantes indemnes de maladie.

Mais malgré sa prépondérance, elle nécessite un fort investissement en recherche et développement pour la maîtriser parfaitement.

La culture in vitro consiste, à partir d'un morceau d'une plante initiale, à régénérer, par une culture sur un milieu riche et complet en conditions stériles, une ou plusieurs plantes entières strictement identiques à cette dernière.

En théorie, cela semble simple à réaliser dans l'environnement contrôlé du laboratoire mais comme en pleine nature le travail s'effectue sur des organismes vivants en perpétuelle évolution.

De nombreux facteurs peuvent causer l'échec de la culture : les facteurs liés à la plante (organes, physiologie, date de prélèvement...), les conditions physico-chimiques du milieu de culture et environnementales...

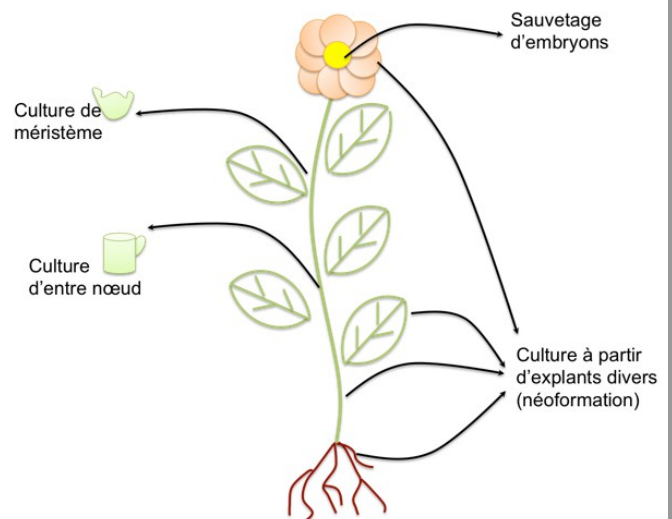
Comme en production, chaque variété requiert une conduite culturale personnalisée. En culture in vitro, 4 phases essentielles avec leur méthode et leur milieu de culture spécifiques doivent être adaptées à la variété :

-la mise en culture ou introduction in vitro de la plante. Le choix du type d'explant, la qualité du plant initial, la saison de prélèvement sont par exemple essentiels à la réussite de cette étape ;

-la multiplication des plants;

-l'enracinement des plants ;  
-l'acclimatation des plants,

e. le transfert des plants du milieu in vitro en pleine terre. Cette étape est délicate car les plantes doivent s'adapter très rapidement à des conditions beaucoup moins favorables et très variables qu'en culture in vitro.



*Types d'explants issus d'une plante-initiale utilisable en culture in vitro*

Le temps de développement de la technique, spécifique de la variété, est long à cause des nombreux paramètres à tester. Par exemple, le test d'un milieu de culture peut durer 4 mois vu qu'il doit être répété 3 à 4 fois avant d'en appréhender tous les effets. Ou encore, avec un milieu de culture adapté à la variété, la mise en culture peut durer 2 à 6 mois.

### CONSEILS

**Lien :** <http://ciref-agriculture.fr/revue-de-presse/le-defi-de-la-recherche-et-du-developpement-en-culture-vitro/>

## CULTURE IN VITRO

# Les bases de la culture in vitro (II)

Un métier très artisanal mais aussi hautement technologique.

---

La culture in vitro est à la fois un métier très artisanal mais aussi hautement technologique.



*Comportement différent de la variété « Gariguette » en culture in vitro avec deux milieux de culture différents (base minérale et taux d'hormone)*

La réussite de la culture in vitro, qui peut s'apparenter à de la microchirurgie, nécessite à la fois de techniciens hautement qualifiés pour manipuler les plantes et observer les cultures, et le développement de protocoles spécifiques à chaque variété et même laboratoire. En effet, un protocole établi dans un laboratoire devra être adapté dans un autre.

### CONSEILS

Par exemple, le simple changement de type de contenant de culture génère aux plants un aspect complètement différent. Ainsi, au même titre qu'un terroir pour la vigne, chaque laboratoire produit des

plants spécifiques et uniques.

Les pistes de développement sont multiples à chaque nouvelle plante.

C'est pourquoi, les laboratoires de culture in vitro travaillent en collaboration en réseau national et international afin de mettre en commun les expertises et accélérer la recherche et le développement.

### ZOOM

Si ce sujet vous intéresse, venez échanger vos points de vue avec notre responsable du laboratoire de culture in vitro, Justine Perrotte, lors du PERIFEL 2015, ce 1er octobre à Douville !

**Par exemple, le simple changement de type de contenant de culture génère aux plants un aspect complètement différent.**

# Les fruits déformés (I)

## Un exemple de solutions

### **La problématique des fruits déformés : exemple de recherche de solutions pour les producteurs avec le projet QualiFraise.**

18. décembre, 2015 | Publié par Isabelle Ciref.fr

Parmi les problèmes de production auxquels les producteurs doivent parfois faire face, celui de la déformation du fruit n'est pas le moindre. Il est observé de façon plus ou moins marquée sur de nombreuses variétés. Ce problème est complexe car les causes possibles sont multiples et en forte interaction comme l'ont montré les travaux réalisés par le Ciref depuis 2010 sur son réseau de producteurs référents dans le sud-ouest.

Cette région s'avère être celle où le problème est le plus fréquent notamment pour les fraises remontantes. Pics de chaleur, attaques de punaises, origines du plant, conduites culturale ont pu fournir des débuts d'explications mais des zones d'ombre demeurent.

C'est la raison pour laquelle le Ciref a décidé en 2013 de lancer une réflexion approfondie sur le sujet avec le concours de l'INRA en s'appuyant sur le comportement de la variété de référence sur le créneau remontant : Charlotte. Initié en 2014, le projet « QualiFraise » déposé au printemps 2015 a été labellisé en juin par le pôle de compétitivité Agri Sud-Ouest Innovation.

L'accord de consortium Inra-Ciref-Invenio s'est finalisé en septembre, et pour finir l'accord de financement par la région Aquitaine a été suivi de l'accord du FEDER (Fonds européens) le 13 octobre dernier. C'est donc après une gestation de près de 2 ans que ce projet « QualiFraise » a pu être lancé ! Mais qu'en est-il au juste ?

L'objectif de « QualiFraise » est « d'identifier les facteurs génétiques, épigénétiques, physiologiques, et de pathologie garantissant la stabilité de la qualité de production à partir de la variété Charlotte ». Il se propose d'étudier le problème de fruits déformés en s'appuyant sur cette variété référente en considérant tous les niveaux de production du plant et du fruit. Le Ciref est le porteur du projet. Les partenaires sont

Fraise Concept, Invenio et l'UMR 1332 de l'INRA de Bordeaux. Des prestataires participent également au projet, comme des laboratoires de culture in vitro, l'Université de Paris-Sud, des pépiniéristes et des OP. La durée du projet est de 42 mois (de juillet 2015 à fin 2018).

### **Ce projet se décline en 5 actions.**

**La 1ère action** concerne l'étude de la stabilité génétique et sanitaire de Charlotte lors de sa conservation au Ciref, le mainteneur. Elle verra la comparaison morphologique et génétique des clones de maintien et l'étude fine de leur état sanitaire par recherche de virus sans a priori (le contrôle actuel se fait tous les ans sur les 5 virus de quarantaine, comme requit par le schéma de certification et identique pour toutes les variétés, y compris Gariguette).

**La 2ème action** porte sur l'évaluation de l'influence de la culture in vitro, c'est-à-dire la production des plants F1, avec leur analyse épigénétique (c'est à dire l'étude des changements d'activité des gènes par modification de la chromatine (ADN), sans altération génétique), et l'étude de leur sensibilité variétale aux conditions de culture in vitro et à la régénération.

**Avec la 3ème action**, c'est l'influence de la phase de la multiplication en pépinière pour la production de plants commerciaux qui sera étudiée: l'une des spécificités de Charlotte est d'être multipliée par un grand nombre de pépiniéristes, et donc par autant de pratiques de multiplication. Cette action s'appuiera sur une enquête auprès de tous les multiplicateurs de la variété pour étudier leur pratiques, notamment culturales.

### **CONSEILS**

**LIEN :** <http://ciref-agriculture.fr/revue-de-presse/la-problematique-des-fruit-deformes-exemple-de-recherche-de-solutions-pour-les-producteurs-avec-le-projet-qualifraise/>

# Les fruits déformés (II)

## nUn exemple de solutions

---

**La 4ème action** de ce projet porte sur la production de fruits chez des producteurs. L'étude des facteurs influant sur la pollinisation et sur la fécondation des ovules sera effectuée avec les moyens les plus modernes disponibles à l'INRA de Bordeaux. Elles seront complétées par une étude du virome (charge en virus, pour faire simple) entre des plants à comportements différents en termes de fruits déformés.

Les vitroplants et plants issus des actions précédentes seront testés dans cette action.

Ce projet fait appel à de nombreuses compétences pluridisciplinaires et complémentaires. C'est la responsabilité du Ciref, dans la 5ème action, de coordonner toutes les parties prenantes, scientifiques, techniques et professionnelles autour d'un sujet fédérateur qui a su attirer l'attention du Conseil régional d'Aquitaine qui apporte son soutien, ceci pour le profit

-des consommateurs (qui plébiscitent les variétés

gustatives),

-des commerciaux (qui ont besoin d'un beau produit qui peut leur permettre de se différencier par rapport aux produits d'importation),

-des producteurs (qui doivent pouvoir rentabiliser leurs outils de production sur un produit stable avec peu d'écart de récolte), des pépiniéristes (qui ont besoin d'ajuster leurs itinéraires

techniques), du Ciref (qui doit se nourrir de ses avancées scientifiques pour créer de nouvelles variétés moins sensibles à ces aléas), et

-de la communauté scientifique, INRA compris, pour qui cet exemple de collaboration tripartite de longue durée doit rester un exemple pour l'avenir commun.

### CONSEILS

**LIEN :** <http://ciref-agriculture.fr/revue-de-presse/la-problematique-des-fruit-deformes-exemple-de-recherche-de-solutions-pour-les-producteurs-avec-le-projet-qualifraise/>

# Quelle technologie?

## Apperçu de la technologie de laboratoire.

**Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1999, 138, 19-48**  
**LA RÉGÉNÉRATION IN VITRO DU FRAISIER**  
**(FRAGARIA X ANANASSA DUCH.) (\*)**

I - Les différentes phases de la micropropagation  
E. M. EL HAMDOUNI (1), A. LAMARTI (1), A.  
BADOUC (2)

LIEN :

<http://www.socpharmbordeaux.asso.fr/pdf/pdf-138/138-019-048.pdf>

Depuis la description par Boxus et al. en 1977 d'un protocole pour la régénération de millions de plantules de Fraisier à partir d'un seul méristème, cette production de masse a été adoptée par divers laboratoires à travers le monde et a été depuis modifiée, améliorée et adaptée pour divers cultivars.

Les travaux sur la micropropagation du Fraisier sont passés en revue, tout en exposant les différents milieux et conditions de culture.

### INTRODUCTION

Le genre *Fragaria*, de la famille des Rosacées, renferme une cinquantaine d'espèces essentiellement de l'Hémisphère Nord. Les espèces présentent 4 groupes de ploïdie (diploïde, tétraploïde, hexaploïde et octoploïde) avec un nombre chromosomique de base 7.

(\*) Manuscrit reçu le 2 novembre 1999

(1) Laboratoire de Biotechnologie et d'Amélioration des plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences Mhanach II, BP 2121 Tétouan, 93002 Maroc.

(2) Laboratoire de Mycologie et Biotechnologie végétale, Faculté des Sciences

Pharmaceutiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 3, place de la Victoire, 33076 Bordeaux Cedex.

20

Le Fraisier cultivé, *Fragaria X ananassa* Duch., est octoploïde ( $2n = 8x = 56$ ) et est issu d'un hybride spontané entre deux espèces octoploïdes originaires d'Amérique, *Fragaria chiloensis* Duch. et *F. virginiana* L. .

Le Fraisier de Virginie a été introduit en Europe vers le XVII<sup>e</sup> siècle ; le Fraisier du Chili, qui doit son nom d'espèce au fait qu'il est indigène dans l'île de Chiloe, a été rapporté du Chili en France par Frézier en 1715 [16].

Les fraises sont produites aussi bien pour la consommation à l'état frais que pour l'industrie agroalimentaire. La qualité du fruit est l'objectif

principal de la sélection des variétés. La précocité, la fermeté, la couleur, le goût, l'acidité du fruit, la durée de conservation, telles sont les principales qualités exigées par le marché. Les fraises sont fréquemment endommagées par l'attaque des insectes, des champignons, des nématodes, des virus et par le gel. La recherche de variétés résistantes constitue l'essentiel des travaux de biotechnologie sur le Fraisier.

Les techniques de régénération in vitro chez le Fraisier ont été fortement utilisées comme alternative à la propagation traditionnelle. Belkengren et Miller [13] ont recommandé les premiers l'utilisation de la culture des méristèmes pour l'élimination des virus. Adams [2] a obtenu le premier en 1972 un nombre illimité de plantules à partir d'un seul méristème par ajout de cytokinines dans le milieu de culture. L'année suivante, Nishi et Ohsawa [89] ont proposé une technique de régénération des bourgeons sur des calcs induits à partir de méristèmes apicaux pour la production de masse de plantes non virosées du Fraisier. Cependant, cette technique a favorisé l'apparition de plantes présentant des altérations phénotypiques non désirées.

Pour résoudre ce problème, Boxus [17] a mis au point une technique qui prévient la formation de cal et permet la prolifération de bourgeons adventifs multiples par une concentration de benzyladénine dix fois plus élevée que celle utilisée par Adams [2]. Puis Boxus et al. [18] ont décrit un protocole pour la production de millions de plantules à partir d'un seul méristème, et ce protocole a été testé sur 74 variétés et adopté pour la propagation de masse du Fraisier. Il a été depuis modifié, amélioré et adapté pour divers cultivars.

De même, des travaux de régénération à partir de divers explants ont été menés avec succès par organogenèse directe ou après callogenèse. Ainsi, des plantules ont été régénérées à partir de la culture de fragments de cotylédons [75], de stipules [106,etc.], de pétioles [39,50,57,98,etc.], de limbes [9-10,35,39,50,53,57,62,66,84-85,88,98,110], de stolons et/ou de pédoncules [53,65-66], de pétales [99], d'anthers [28,102,105,113,etc.], d'ovaires non pollinisés [11,99], d'akènes immatures [64], d'embryons immatures [122].

Cependant, vu certaines instabilités génétiques rencontrées chez les plantes régénérées, surtout à partir de calcs, de protoplastes ou de suspensions cellulaires [28,52,86-87,89-90,98,102], seuls les méristèmes sont utilisés pour l'initiation de la micropropagation destinée

à la production commerciale de plants de Fraisier. La présente revue expose les différentes phases de la micropropagation du Fraisier.

## **LES DIFFÉRENTES PHASES DE LA MICROPROPAGATION**

Pour initier un processus de micropropagation, on utilise souvent comme source d'explants des plantes mères cultivées dans des conditions optimales, aussi bien du point de vue sanitaire que physiologique pour garantir une réponse uniforme des explants et un faible taux de contamination durant la phase de multiplication [30].

Ainsi, on utilise souvent comme source d'explants des plantules issues de la germination stérile d'akènes ou des plantes cultivées en serre avec une photopériode de 16 heures de lumière par jour et une température comprise entre 20 et 25 °C [2,4,22-23,49,58,70,78,107] ou cultivées en plein champ [36,48,54-55,68,87,126]. Cependant, dans ce dernier cas, les explants prélevés présentent une probabilité de contamination [97]. En général, il est convenable de réaliser un indexage des virus avant l'établissement des explants in vitro [73,77,87].

La micropropagation du Fraisier nécessite 4 phases [17,82,etc.] :

- phase d'établissement des cultures,
- phase de multiplication ou de prolifération,
- phase d'enracinement,
- phase d'acclimatation ou de transfert des plants en terre.

### **PHASE D'ÉTABLISSEMENT DES CULTURES**

Cette phase a pour but d'obtenir des souches de départ qui vont servir de base à la production de plants. Elle consiste en l'établissement de cultures dans des conditions aseptiques favorisant une croissance modérée des explants [30,80].

La contamination est le principal problème à maîtriser pendant cette phase [115]. La désinfection superficielle varie suivant les auteurs.

L'hypochlorite de sodium est très utilisé [21,67,115]. Certains auteurs préfèrent l'hypochlorite de calcium [22,82]. Parfois, une brève immersion antérieure dans l'éthanol est recommandée [21].

Cependant, les infections internes du matériel ne peuvent être éliminées par stérilisation superficielle. La culture de méristèmes et l'ajout

d'antibiotiques au milieu sont alors deux techniques efficaces [97].

L'utilisation d'antibiotiques pour lutter contre les infections internes du

Fraisier et d'autres plantes fruitières a été signalée par Skirvin [109] et Phillips

et al. [96].

De plus, Mc Grew [73] a remarqué des différences dans les

pourcentages de contamination en fonction des variétés et de la saison de

l'année à laquelle a lieu le prélèvement des apex. Pour Swartz et Lindstrom

[115], l'établissement de la culture in vitro du Fraisier peut se faire tout le

long de l'année même si la contamination est plus accentuée de la fin de l'été

jusqu'à l'hiver. Bakun [8] a recommandé l'initiation des cultures début juin,

Maliarciková [68] en août et pour Antonelli [5] les explants peuvent être

prélevés en hiver moyennant une stérilisation sévère.

Tous les bourgeons de la plante peuvent être utilisés pour initier les

cultures, les méristèmes des différents bourgeons ne différant pas quant à leur

capacité de régénération [21,27]. En général, les méristèmes sont prélevés sur

les stolons et les explants sont de 3 types : apex des stolons, bourgeons

axillaires des feuilles nées sur les filaments stolonifères (jeunes stolons) et

bourgeons axillaires des feuilles principales du stolon [49,51,61]. Le

prélèvement des explants sur des stolons jeunes paraît plus facile que sur des

stolons âgés et les plantes en repos ou cryoconservées présentent un

pourcentage élevé d'infections internes [18].

La taille des apex utilisés varie entre 0,1 et 10 mm [33,56,67,82,87,112].

La dissection des apex doit être réalisée dans des conditions aseptiques.

Mc Grew [73] prélève les méristèmes en réalisant de fines coupes

longitudinales du bas vers le haut de l'explant jusqu'à obtenir un cône qui

inclut la cupule apicale et 1 ou 2 feuilles primordiales.

Pour Damiano [27], la durée de la phase d'initiation doit être de 45 jours

si on utilise des petits apex et de 30 jours pour des explants plus âgés. Pour

Hunter et al. [48] et Zuccherelli [126], elle doit être de 1 à 3 mois.

Durant la phase d'initiation, Swartz et Lindstrom [115] ont signalé que

les apex du Fraisier sont très sensibles aux intensités de lumière élevées (> 30



$\mu\text{Moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) et produisent rapidement des tanins si on ne maintient pas une intensité modérée de lumière. Pour résoudre ces problèmes, ces auteurs suggèrent la diminution de la concentration en nitrates ou l'augmentation de celle de calcium dans le milieu de culture.

Les concentrations en cytokinines sont réduites lors de la phase d'établissement comparativement aux phases ultérieures (Tableau I). Mc Grew [73], Shoemaker et al. [107] et Swartz et al. [114] n'ont pas utilisé de phytohormones et Mullin et Schlegel [78] seulement des auxines. Cependant, la majorité des auteurs [15,17-18,24,27,58,82,126] ont employé les auxines avec les cytokinines et les gibbérellines pour l'établissement des cultures. Ainsi, pour Boxus et al. [18], les bons résultats obtenus pendant la phase d'initiation sont dus à l'effet conjugué de la présence de benzyladénine ou benzylaminopurine (BA) et d'acide indolbutyrique (AIB) dans le milieu.

#### **PHASE DE MULTIPLICATION**

Cette phase est la plus importante du fait que le coefficient de multiplication constitue le critère économique majeur de la propagation. Elle a comme objectif l'obtention d'un nombre élevé de plantules de bonne qualité en une courte durée. Ainsi, à la fin de la phase d'établissement, les explants issus de méristèmes sont repiqués sur un milieu frais et enrichi en cytokinines (Tableau I). Après deux à trois semaines, des bourgeons axillaires se forment à la base de chaque pétiole [17]. On obtient une masse de bourgeons sans racine et présentant des feuilles unifoliolées. Boxus [17] et Boxus et al. [21] observent qu'après 6 à 8 semaines cette masse atteint un diamètre de 3 à 4 cm et présente 15 à 25 bourgeons qui seront séparés et transférés sur un nouveau milieu frais. Le processus peut se répéter indéfiniment [21-22,27] et plus d'un 24

million de plantes nouvelles peuvent être produites de cette manière en l'espace d'une année en partant d'un seul méristème. La durée et le nombre total de subcultures varient selon les auteurs.

Ainsi, les bourgeons axillaires peuvent être repiqués toutes les 2 à 3 semaines [47-48,126] ou tous les mois [4,24,27,32,43,56,115]. Jemmali et al. [55] et Zuccherelli [126] ont signalé que pour réduire les risques de variation chez les plantes micropropagées, le nombre de passages doit être limité et les clones renouvelés au moins une fois par an. Bakun [8] a proposé un cycle de micropropagation de 11 mois et Rancillac et al. [104]

ont suggéré de ne pas

#### **Tableau I : Composition de quelques milieux de culture (solution minérale et phytohormones) utilisés dans la micropropagation du Fraisier**

Les auxines jouent un rôle important dans l'élongation, le tropisme, la dominance apicale, l'abscission, l'enracinement et d'autres phénomènes physiologiques [14]. Dans la culture in vitro les auxines sont utilisées pour l'induction du cal, la différenciation des racines et l'élongation des cellules.

Les auxines les plus connues sont l'acide 3-indolacétique (AIA), l'acide naphthalène acétique (ANA), l'acide  $\beta$ -naphthoxyacétique (NOA), l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), l'acide p-chlorophénoxyacétique (pCAA) et l'acide 3-indolbutyrique (AIB) [14,97]. Dans la multiplication du Fraisier, la majorité des auteurs emploient l'AIB [2,4,7,17,27,51,55,58,68,71,82,93,95,101,103,120], l'AIA [1,61,79,82] ou l'ANA [71,121].

Les cytokinines permettent en culture in vitro d'induire la formation de bourgeons axillaires, et ce en contrariant la dominance apicale [14,97]. Les cytokinines les plus utilisées sont l'isopentényladénine (2ip), la kinétine et la benzyladénine (BA) [14]. Pour la culture du Fraisier, même si certains auteurs ont utilisé la kinétine [79,121], la BA semble préférée. Ainsi, Hunter et al. [49] ont obtenu de meilleurs résultats avec la BA dans la phase d'initiation qu'avec la 2ip ; de plus, durant la phase de multiplication, la BA a permis une augmentation du poids de matière fraîche et du taux de multiplication comparée à la 2ip et la kinétine. Néanmoins, la kinétine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la dormance axillaire à des concentrations élevées comme 50  $\mu\text{M}$  [121].

Les gibbérellines permettent l'induction de l'élongation des entre-nœuds et la croissance des bourgeons [97]. Chez le Fraisier, l'acide gibbérellique AG3 paraît avoir un rôle dans le contrôle du taux de multiplication [82]. Cependant, O'Riordáin [92] a remarqué que l'addition d'AG3 au milieu de culture a un effet négatif sur la

multiplication de la variété 'Clonard'.

Pour la phase de multiplication, bien que la culture de méristèmes soit largement utilisée pour la production de masse du Fraisier cultivé, il n'y a pas d'accord entre les auteurs quant aux concentrations d'auxines et de cytokinines dans le milieu de culture (Tableau I). Ainsi, Boxus [17] et Boxus et al. [22] ont rapporté une prolifération rapide de plusieurs variétés sur un milieu contenant 1 mg/l (4,44  $\mu$ M) de BA et 1 mg/l (4,92  $\mu$ M) d'AIB. James et Newton [51] ont cherché l'effet de l'interaction in vitro des auxines et cytokinines sur la croissance et la prolifération de la variété 'Gento' et ont obtenu les meilleurs résultats avec des concentrations de BA comprises entre 0,05 et 0,5 mg/l combinées avec 0,05 et 0,2 mg/l d'AIB.

Marcotrigiano et al. [71] n'ont pas trouvé de différence dans le taux de prolifération des bourgeons entre 16 variétés nord-américaines cultivées sur des milieux contenant 0,3 à 3 mg/l de BA. Simpson et Bell [108] ont reporté chez 6 génotypes des réponses variables aux différentes concentrations de BA dans le milieu de culture.

Ces différentes études suggèrent donc une optimisation de la concentration en phytohormones pour chaque génotype avant de lancer le processus de micropropagation pour la multiplication de masse.

#### • Complexes organiques

En culture in vitro, de nombreux complexes sont employés comme nutriments organiques. Ainsi, on utilise le jus de tomates, la caséine hydrolysée, le lait du maïs ou de noix de coco [14].

Le lait de coco a été ajouté aux premiers milieux de micropropagation du Fraisier [13,120]. Mais Pierik [97] conseille de ne pas faire appel à ces complexes dans les travaux de recherche du fait de leur composition variable ou inconnue.

Conditions environnementales

Si de nombreuses études ont porté sur la standardisation du milieu de culture et les régimes phytohormonaux pour la régénération des bourgeons à partir des méristèmes apicaux, peu de travaux ont porté sur la définition de l'environnement de ce processus. Pierik [97] a signalé qu'on connaît généralement peu l'influence des facteurs physiques sur la croissance des plantes in vitro et c'est également le cas pour le Fraisier

[116].

#### • Température

Adams [2] et Boxus et al. [21-22] ont pu initier avec succès la culture des explants à 25°C. Pour leur part, Boxus et al. [22] recommandent une température de 24°C, alors que Mullin et al. [79] travaillent à 27°C. Swartz et al. [116] ont signalé qu'aux Etats Unis la température des chambres de culture est maintenue à 20°C. La température de 28°C a été signalée comme optimale par Hunter et al. [48] qui ont travaillé dans une gamme de température allant de 12 à 36°C. Cependant, Damiano [27] n'a pas observé de différence significative avec des températures comprises entre 20 et 28°C. Les températures entre le jour et la nuit sont parfois différentes ; ainsi, James et Newton [51] ont utilisé respectivement 25 et 20°C et Bjurman [15] 26 et 22°C (Tableau III).

#### • Humidité relative

L'effet de l'humidité relative des chambres de culture sur la croissance n'a pas bien été étudiée mais son contrôle est important pour prévenir la dessiccation des explants [38]. Cette humidité se maintient généralement aux alentours de 70 %, sachant que des valeurs supérieures peuvent causer des problèmes d'infection [97].

Tableau III : Quelques conditions d'incubation des cultures durant la micropropagation in vitro du Fraisier

#### • Éclairement

La lumière influence la micropropagation par ses 3 composantes : l'intensité, la durée (photopériode) et la longueur d'onde utilisée.

Le terme intensité de lumière a été utilisé pour quantifier la densité de flux lumineux que reçoivent les cultures durant le processus de micropropagation. L'intensité optimale varie suivant la phase du processus, le type d'explant et l'espèce végétale [34].

Chez le Fraisier, Boxus et al. [22] considèrent que les intensités comprises entre 1000 et 1500 lux sont suffisantes pour la phase d'initiation et celles comprises entre 500 et 1000 lux pour les phases de multiplication et d'enracinement. Cependant, les intensités des différents

travaux oscillent dans une gamme très large allant de 1000 à 15000 lux (Tableau III).

Bhojwani et Razdan [14] ont signalé que la photopériode n'est pas un facteur critique dans la croissance des plantules in vitro.

Chez le Fraisier, les premières micropropagations ont eu lieu à l'obscurité pendant 8 jours puis en lumière continue [13]. Après, on a utilisé une photopériode allant de 18 heures [44,79] à 12 heures [51] et la majorité des auteurs utilisent une photopériode de 16 heures (Tableau III).

La qualité de lumière revient aux longueurs d'onde spectrales de

l'émetteur ; les principales lampes utilisées sont Cool-White, Warm-White et

Gro-Lux [34].

Chez le Fraisier, on utilise principalement des lampes Cool-White

[22,27,32-33,61,70] et à petit échelle des tubes Warm-White [49] et Gro-lux

[22,121]. Hennerty et al. [47] ont utilisé une combinaison de lampes Warm-White et Gro-lux. Kartha et al. [58] ont utilisé une combinaison de lampes fluorescentes et incandescentes.

#### **PHASE D'ENRACINEMENT**

Cette phase a pour objectif d'assurer l'enracinement des vitropousses issues de la phase de multiplication et de les préparer à la phase d'acclimatation. Chez le Fraisier, à la fin de la phase de prolifération, les 34 touffes sont divisées et les pousses transférées sur un milieu sans cytokinine et additionné ou non d'auxines (Tableau I). Le développement des bourgeons axillaires cesse immédiatement, des feuilles trifoliolées font leur apparition, les plantules commencent à s'allonger et au bout de six semaines environ on

obtient des plantules de 3 à 4 cm de longueur enracinées [17-18,82]. La durée

de cette phase peut être réduite de 10 à 12 jours par incorporation au milieu de

culture de 500 mg/l de charbon actif [26]. Damiano [27] a remarqué que

l'addition de 1 à 2 g/l de charbon actif au milieu d'enracinement réduit le

temps nécessaire à l'émission des racines et accélère leur croissance. De

même, Kyte [61], Boxus et al. [21] et Desjardins et al. [32] ont rapporté un

effet similaire à une concentration de 0,5 à 0,8 g/l.

A l'exception de la variation de la balance phytohormonale (addition

d'auxines et élimination des cytokinines), toutes les autres conditions de

culture sont maintenues [27].

#### **PHASE D'ACCLIMATATION**

L'acclimatation est la phase la plus critique de la micropropagation chez

plusieurs espèces végétales et constitue, avec ses nouvelles conditions in

vivo, un obstacle majeur pour l'utilisation de la micropropagation à l'échelle industrielle à cause des

problèmes de survie [111]. Le stress hydrique et la faible capacité de photosynthèse sont les deux

principaux facteurs responsables du faible taux de survie des vitroplants en champ [100].

Chez le Fraisier, espèce dont les feuilles formées in vitro développent une faible capacité photosynthétique [40], cette phase est rendue plus difficile.

Cependant, si certains auteurs [18,25,82] obtiennent un pourcentage de survivants compris entre 95 et 100 %, d'autres indiquent une faible capacité de transpiration

et de photosynthèse d'où des pertes considérables ; un quart seulement des feuilles formées in vitro persistent

après une soixantaine de jours en conditions in vivo ; en général, les feuilles formées in vitro ne fixent pas

suffisamment de carbone et dégénèrent progressivement [41].

Le transfert des plantules vers les conditions in vivo se fait généralement après la phase d'enracinement qui a

lieu in vitro [3,15,25,27,94,117]. Cependant, il est possible de passer directement de la phase de la

multiplication à un substrat d'enracinement in vivo [3]. Ainsi, Bakun [8] a pu enraciner avec succès les

vitropousses du Fraisier directement sur perlite.

Les explants issus de culture in vitro, enracinés ou non, sont lavés tout d'abord avec de l'eau pour se

débarrasser de la gélose, puis sont séparés en colonies [25] ou en éléments individuels [21,27,44,117] et

déposés sur un substrat adéquat. Plusieurs types de substrats sont utilisés durant cette phase seuls ou en

mélange avec des volumes définis : tourbe seule [21,27,83,94,114], mélanges tourbe - sable (1:1)

[25,27,43], tourbe - perlite (3:1) [67,126], tourbe - vermiculite (1:1) [76], tourbe - perlite - vermiculite

(1:1:1) enrichi par des fertilisants [36] ou tourbe - compost - sable (1:1:0,2)

[117].

L'acclimatation est initiée normalement en serre standard [47,117] ou

sous tunnel de plastique [36,43]. Durant cette phase, l'humidité relative est

maintenue à des valeurs généralement élevées pour éviter la dessiccation :

plus de 90 % [21], 80 % [25,125], voire à 40 ou 60 % seulement [36]. Les températures pendant la première

phase de l'acclimatation sont maintenues au dessous de 26,6°C [115]. Quant à la durée d'éclairement, Damiano

[27] a remarqué qu'une longue photopériode pendant la phase d'acclimatation favorise un développement

rapide des plantes.

De plus, des traitements particuliers peuvent être apportés durant la phase d'acclimatation, telle

l'application d'un fongicide au moment du transfert et durant la phase d'acclimatation [20]. De même,

l'enrichissement de l'atmosphère en CO<sub>2</sub> accélère et améliore la croissance végétative des plantules en acclimatation [32].

La durée du processus d'acclimatation semble dépendre des saisons [3,93]. Cette durée est normalement de 4 semaines [22]. Anderson [3], Shoemaker et al. [107], Zuccherelli [126] préfèrent prolonger la période d'acclimatation jusqu'à 6 ou 7 semaines. De même, Navatel [83] et Pennell [93] recommandent le maintien des plantes en serres pendant 2 mois pour obtenir un matériel suffisamment vigoureux avant son transfert en champ.

## **CONCLUSION**

Si la culture de méristèmes chez le Fraisier (*Fragaria X ananassa* Duch.) a été appliquée au début pour l'éradication des virus et la production de plantules indemnes de maladies, la micropropagation est devenue une technique de choix pour la production de masse de plantules à travers le monde depuis l'établissement d'un schéma général de production par Boxus et al. En 1977 [22]. Cependant, comme l'ont suggéré Simpson et Bell [108], le milieu doit être adopté pour chaque génotype pour obtenir les meilleurs résultats. En effet, si le

milieu minéral utilisé par la majorité des auteurs est celui de Boxus [17] ou de Murashige et Skoog [81] et si les vitamines ou les sucres ou même les conditions de culture ne montrent pas une grande hétérogénéité, la solution phytohormonale, au contraire, varie énormément d'un laboratoire à l'autre quant aux concentrations utilisées.

Pendant la phase de multiplication, il n'y a pas d'accord quant au nombre de subcultures et la plupart des auteurs proposent de réduire le nombre de passage pour minimiser les risques d'accidents physiologiques et agronomiques chez les plantes micropropagées. Le nombre idéal de subcultures permettant d'assurer la stabilité phénotypique n'étant pas établi, il est très important d'évaluer les plantes obtenues par micropropagation pour leur performance au champ ou pour l'apparition de phénotypes anormaux avant qu'un système de production ne soit adopté pour des processus commerciaux.

## **RÉFÉRENCES**

Très nombreuses références.

# Où trouver des stages in-vitro (I)?

**Le Ciref.fr, des stages de haut niveau.**

---

## **STAGE DE NIVEAU MASTER ou LICENCE PROFESSIONNELLE, 2016**

Sujet du stage : Optimisation du protocole de culture in vitro pour la production de plants de fraisier Lieu du stage : Laboratoire de culture in vitro, à Douville (24140)

Période du stage : 6 mois à partir d'avril 2016

Présentation du stage: Fraise concept (filiale commerciale du Ciref), en collaboration avec l'INRA de Bordeaux, le Ciref (centre de création variétale fraise et fruits rouges) et Invenio (centre de recherche et d'expérimentation de la filière Fruits et Légumes d'Aquitaine), est engagé dans un projet de recherche visant à apporter des solutions techniques à la culture de fraise pour assurer la stabilité de la qualité de sa production.

Plusieurs millions de plants de fraisiers sont produits par an en France. La première étape de cette production est la production de plants de base via des méthodes de culture in vitro. Un protocole unique est utilisé depuis une quarantaine d'années pour toutes les variétés existantes sur le marché. Dans sa démarche de production de plants de qualité, notre laboratoire de culture in vitro vise à proposer à terme un protocole optimisé pour chaque variété.

L'objectif de ce stage, en utilisant quatre variétés aux comportements contrastés et de différentes origines, est d'optimiser et d'adapter le protocole de culture in vitro à chaque variété. Ce stage permettra la production de plants in vitro qui seront ensuite observés en conditions de multiplication et de production les

saisons suivantes.

### **Ce stage se décompose en deux parties :**

- 1.influence du type de travail du plant en multiplication in vitro sur la qualité du plant ;
- 2.influence de la composition du milieu de culture en multiplication in vitro sur la qualité du plant :
  - a.composition hormonale (qualitative et quantitative) ;
  - b.composition minérale (qualitative et quantitative).

Le stage fait appel aux méthodes et techniques suivantes : recherche bibliographique, mise en place du dispositif expérimental, techniques de culture in vitro (travail sous hotte à flux laminaire en conditions stériles), notations de la qualité des plants, caractérisation du type de développement, analyses statistiques.

Le sujet et les analyses statistiques seront adaptés au diplôme de l'étudiant (Licence ou Master).

Indemnisation (3,60€ par heure effective de présence), possibilité de logement contre participation, si réponse rapide.

Encadrement : Dr. Justine Perrotte, responsable du laboratoire de culture in vitro.

### **ZOOM**

Si vous êtes intéressé par ce stage, envoyez votre CV et lettre de motivation à Justine Perrotte (E-mail : [justine.perrotte@ciref.fr](mailto:justine.perrotte@ciref.fr)).

# Où maîtriser la technique in-vitro (II)?

En s'inscrivant au stage du Ciref.fr

« **FRAISIER : STABILITE DE LA QUALITE DU FRUIT: ETUDE DE LA VARIABILITE EN FONCTION DU FOND GENETIQUE, DE L'ORIGINE DU PLANT ET DES CONDITIONS DE CULTURE SUR L'ASPECT DU FRUIT, SES QUALITES GUSTATIVE ET NUTRITIONNELLE**»

**Maître de stage :** Philippe CHARTIER, sélectionneur  
e-mail : philippe.chartier@ciref.fr  
tél: 0553803933 portable: 0672911902

Description du stage:

Lieu: Ciref DOUVILLE / Dordogne (24)

Date de début de stage souhaitée: mars 2017

Durée : 6 mois

Thème du stage :

Le Ciref est l'outil de création variétale de la profession fraisicole française. Son programme de sélection est principalement axé sur la qualité du fruit, critère de différenciation essentiel pour les producteurs français. L'aspect du fruit et sa qualité gustative, associés aux composantes de rendement commercial et aux résistances aux pathogènes sont les axes principaux du programme de création variétale du Ciref. Celui-ci est validé par son Conseil d'Administration majoritairement constitué de représentants des Organisations de Producteurs nationaux.

L'objectif du stage est d'étudier l'impact de l'origine du plant ou du fond génétique sur le potentiel de rendement et la qualité du fruit. Il reposera sur l'étude

du développement de la plante et du fruit à partir d'une collection variétale et d'une population en ségrégation implantées sur le site de Douville, ainsi que sur une variété d'origine de plants variée (vitroplants/plants F2) implantée chez des producteurs.

Descriptif :

Matériel utilisé : La collection de variétés et la population en ségrégation du projet européen GoodBerry axé sur l'interaction génotype x environnement.

Méthode : Prise en charge de l'expérimentation mise en place, notations, échantillonnage. Analyses physico-chimiques (laboratoire de Douville et de l'INRA de Bordeaux pour les dosages d'antioxydants). Analyse statistique des résultats.

## **ZOOM**

Conditions du stage :

Indemnisation : de base réglementaire, possibilité de logement sur place contre participation.