

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. BADO* ⁽²⁾

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.*

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^e 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 cals 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 cals, 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

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

Solution minérale (durant les 3 phases)		Concentrations en phytohormones (μ M/l) durant les différentes phases			Références
Macro éléments	Micro éléments	Établissement	Prolifération	Enracinement	
MS	MS	4,92 AIB 0,44 BA	-	-	Adams, 1972
Knop [60]	MS	4,92 AIB 0,44 BA 0,29 AG ₃	4,92 AIB 4,44 BA 0,29 AG ₃	4,92 AIB - -	Boxus, 1974
MS	MS	0,25-1 AIB 0,25-2,5 BA	0,25-1 AIB 0,25-2,5 BA	0,25-1 AIB -	James et Newton, 1977
MS Knop	Heller MS	5,71 AIA 0,26 BA 0,29 AG ₃	5,71 AIA 4,44 BA 0,29 AG ₃	4,92 AIB - -	Navatel, 1979
Knop +750 mg/l KNO ₃	MS	4,92 AIB 0,44 BA 0,29 AG ₃	4,92 AIB 4,44 BA 0,29 AG ₃	- - -	Zuccherelli, 1979
Knop	MS	4,92 AIB 0,44 BA 0,29 AG ₃	4,92 AIB 4,44 BA 0,29 AG ₃	4,92 AIB - -	Damiano, 1980
Knop ou Knop x 0,5	MS	- - -	2,46 AIB 4,44 BA 0,29 AG ₃	2,46 AIB - 0,29 AG ₃	Swartz <i>et al.</i> , 1981
MS	MS	0,1-10 AIB 0,1-10 BA 0,30 AG ₃	0,1-10 AIB 0,1-10 BA 0,30 AG ₃	0,1 AIB 5 BA -	Anderson <i>et al.</i> , 1982

Tableau I (suite)

Solution minérale (durant les 3 phases) Macro éléments Micro éléments		Concentrations en phytohormones (μ M/l) durant les différentes phases			Références
		Établissement	Prolifération	Enracinement	
Knop +1,9 g/l NH_4NO_3 MS ou Knop MS Knop	MS	-	-	-	Shoemaker <i>et al.</i> , 1985
		-	4,44 - 22 BA	-	
	MS	4,92 AIB	4,92 AIB	-	Desjardins <i>et al.</i> , 1987
		-	4,44 BA	-	
MS	4,92 AIB	4,92 AIB	-	Harper, 1987	
	4,44 BA 0,29 AG_3	4,44 BA 0,29 AG_3	-		
MS	4,92 AIB 0,44 BA	4,92 AIB 4,44 BA	0,49 AIB -	Thomsen, 1987	
Knop	MS	4,92 AIB 0,44 BA 0,29 AG_3	2,46 AIB 2,22 BA 0,29 AG_3	4,92 AIB - -	Rancillac et Nourrisseau, 1989
		MS	MS	4,92 AIB 0,89 BA 2,89 AG_3	
MS	MS	0,49 AIB 4,44 BA 0,29 AG_3	4,92 AIB 4,44 BA -	2,46 AIB - -	Petrovic et Jacimovic- Plavsic, 1990
MS	MS	- - -	0,49 AIB 2,22 BA 0,29 AG_3	11,42 AIA - -	Moore <i>et al.</i> , 1991
Knop	MS	4,92 AIB 0,44 BA 0,29 AG_3	2,46-9,84 AIB 2,22-8,88 BA 0,29 AG_3	4,92 AIB - -	Merkle, 1993
		N ₃₀ K ou Knop	MS	4,92 AIB 0,44 BA 0,29 AG_3	
MS	MS	- - -	- 4,44 BA	0,54 ou 1,07 ANA	Hammoudeh <i>et al.</i> , 1998

AIA : acide 3-indolacétique

 AG_3 : acide gibbérellique

BA : benzyladénine

AIB : acide 3-indolbutyrique

AN : acide naphthalène acétique

MS : Murashige et Skoog [81]

dépasser 10 subcultures pour réduire les risques d'accidents physiologiques et agronomiques chez les futures plantes. Swartz *et al.* [114] et Harper [43] ont recommandé de ne pas dépasser 6 passages et Theiler-Hedtrich [117] a réduit ce nombre à 3 seulement. Le nombre idéal de subcultures permettant d'assurer la stabilité phénotypique reste à préciser chez le Fraisier [31].

Milieux de culture

• *Agar*

Pour les milieux solides, l'agar est employé à des concentrations comprises entre 0,5 et 1 % (Tableau II). Les concentrations très élevées durcissent le milieu et empêchent la diffusion des nutriments vers les tissus [14]. Pour Damiano [27], la concentration d'agar suggérée par Boxus [17] de 0,8 % n'est qu'indicative d'autant que la qualité de ce produit est variable.

Hunter *et al.* [49] ont étudié le comportement de la variété 'Cambridge Favourite' aussi bien sur des milieux liquides que solides et n'ont pas signalé de différence significative. Cependant, la formation de cals est plus fréquente dans les milieux liquides que solides et la majorité des auteurs utilisent plutôt ces derniers [4,13,17,27,36,41,43,51,59,73,82,89,92,114,117-118] (Tableau II).

• *Hydrates de carbone*

Le sucre est un ingrédient très important du milieu de culture. Les tissus organisés montrent une meilleure croissance et prolifération après l'addition au milieu d'une source adéquate de carbone [14] sachant que le taux de photosynthèse *in vitro* est faible ou quasi nul [97]. La source commune de carbone est le saccharose, additionné à des concentrations comprises entre 1 et 5 % ; de même, le glucose et le fructose sont amplement utilisés [14,97].

Pour la culture du Fraisier, la majorité des auteurs [2,17,21,54,73,79,82,117] ont utilisé le glucose à des concentrations comprises entre 20 et 40 g/l et le saccharose à raison de 20 à 30 g/l [4,13,27,43,69,76-77,101,107] (Tableau II). Les hydrates de carbone présentent des effets très favorables sur la taille et la couleur des plantes obtenues [27].

Tableau II :
Concentrations en agar, en sucres et diverses vitamines utilisés
dans quelques milieux de micropropagation du Fraisier

Agar (g/l)	Sucres (g/l) saccharose : S glucose : G	Vitamines	Références
7	20 G	White [124]	Belkengren et Miller, 1962
0	20 S ou 40 G (établissement) 20 S (multiplication)	MS (établissement) White (multiplication)	Vine, 1968
0	20 S	Wetmore et Sorokin [123]	Adams, 1972
7	20 S	LS	Nishi et Ohsawa, 1973
8	40 G	MS	Boxus, 1974
7	20 S	MS	James et Newton, 1978
7	30 G	MS ou Heller [46]	Navatel, 1979
8	20 S	MS	Damiano, 1980
7	30 S	MS	Anderson <i>et al.</i> , 1982
7	30 G	MS	Oertel, 1981
6	20 S	LS	Kiernan <i>et al.</i> , 1984
10	20 S	MS	Grout et Millam, 1985
8	30 S	MS	Shoemaker <i>et al.</i> , 1985
6	30 S	MS	Harper, 1987
8	30 S	MS	Marcotrigiano <i>et al.</i> , 1987
6	20 S	LS	O'Ríordáin, 1987
8	40 G	MS	Theiler-Hedtrich, 1987
7	30 S	Malone et Dix	Malone et Dix, 1990
2	30 S	MS	Moore <i>et al.</i> , 1991
8	30 S	Yue <i>et al.</i>	Yue <i>et al.</i> , 1993
8	40 G	MS	Jemmali <i>et al.</i> , 1994
8	30 S	MS modifié	López-Aranda <i>et al.</i> , 1994
8	30 S	B ₅ [37]	Nehra <i>et al.</i> , 1994
5,3	40 G	MS	Jemmali <i>et al.</i> , 1995

LS : Linsmaier et Skoog [63]

MS : Murashige et Skoog [81]

- **Vitamines**

Pour obtenir une meilleure croissance des tissus par culture *in vitro*, il est primordial d'ajouter des vitamines au milieu minéral ou des acides aminés [14]. De ces vitamines, on peut citer la thiamine (B₁) qui paraît être un ingrédient essentiel [119], la riboflavine (B₂), l'acide nicotinique (B₃), le pantothénate ou acide pantothénique (B₅), la pyridoxine (B₆), l'acide ascorbique (C), le tocophérol (E), la biotine (H), l'acide folique (M), et l'inositol [14,97].

Différents mélanges de vitamines utilisés dans la culture du Fraisier sont cités dans le Tableau II. La combinaison la plus utilisée est celle de Murashige et Skoog [81]. Mullin *et al.* [79] et Mullin et Schlegel [78] n'ont utilisé pendant la phase d'établissement que la thiamine à 1 mg/l et ont postérieurement transféré les cultures sur d'autres milieux contenant la combinaison vitaminique de Murashige et Skoog. Selon Lee et De Fossard [62], la riboflavine, le pantothénate de calcium, l'acide ascorbique et la biotine sont des composés essentiels pour l'obtention d'un taux élevé de croissance. D'autres mélanges vitaminiques contenant la niacine ont été utilisés par Mc Grew [73] et Swartz *et al.* [114].

- **Sels minéraux : macro et microéléments**

Pour la micropropagation du Fraisier, les solutions minérales les plus utilisées sont celles de Knop [60] de 1965 [15,17,49,55,70,74,94,103,117], de Murashige et Skoog [81] de 1962 [2,4,7,12,41-43,51,58,61,68-69,76-77,89,92,95] et dernièrement les macroéléments N30K [67,72].

La solution minérale de Knop [60] est pauvre en macroéléments et est additionnée dans certains cas de diverses sources d'azote. Damiano *et al.* [29] lui ont ajouté du nitrate de potassium (2-14 mM) pour améliorer le taux de croissance de la variété 'Aliso'. De même, Zuccherelli [126] a augmenté la concentration de nitrate de potassium jusqu'à 1000 mg/l. Shoemaker *et al.* [107], lors de leur étude sur la susceptibilité des plantes issues de la micropropagation des variétés 'Tribute' et 'Raritan' à *Phytophthora fragariae* Hick. et *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold, ont utilisé la solution minérale de Knop additionnée de 1900 mg/l de nitrate d'ammonium. Cependant, Mc Grew [79] et Swartz *et al.* [114] ont employé les macroéléments de la solution de Knop à des concentrations réduites de moitié.

Les concentrations en nutriments des solutions minérales paraissent avoir des effets considérables sur la croissance *in vitro*. Ainsi, Pennell [94] a étudié chez la variété 'Pantagruilla' l'effet des solutions MS, Knop, B₅, Heller, Hewitt et Shenk, Eriksson et Hildenbrandt et a remarqué que si le milieu Knop favorise l'apparition de bourgeons individualisés, le milieu MS donne, au contraire, un bon développement des bourgeons axillaires mais avec des signes de vitrification. De même, Atkinson *et al.* [6] ont obtenu des résultats différents en utilisant les solutions minérales MS et B₅ sur diverses variétés ('Pantagruella', 'Cambridge Favourite', 'Cambridge Vigour', 'Hapil', 'Saladin' et 'Troubadour') et ont suggéré la nécessité de modifier ces solutions. Beech *et al.* [12] ont utilisé la solution minérale MS dans les trois phases de micropropagation des variétés 'Cambridge Favourite', 'Cambridge Vigour', 'Hapil' et 'Redgauntlet' avec des réponses différentes et de ce fait, ont signalé la nécessité de tester chaque variété quant à la réponse aux sels minéraux et aux concentrations en phytohormones avant d'initier un programme de micropropagation à l'échelle commerciale.

Boxus [19] et Mullin *et al.* [79] ont observé une influence du génotype sur le succès du processus de micropropagation du Fraisier. Ainsi, la variété 'Surprise des Halles' a donné un taux de survie allant de 85 à 100 % pendant la phase d'initiation, alors que la variété 'Gorella' a été la plus difficile à s'établir avec un taux de succès de 15 à 20 % seulement [21]. De même, Bakun [8] a obtenu de meilleurs résultats pour la variété 'Desnyanka' que pour les autres variétés étudiées ('Redgauntlet', 'Talisman', 'Nadezhda', 'Festivalnaya' et 'Zarya').

• *Phytohormones*

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 β-naphtoxyacétique (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 μM [121].

Les gibbérellines permettent l'induction de l'élongation des entre-nœuds et la croissance des bourgeons [97]. Chez le Fraisier, l'acide gibbérellique AG_3 paraît avoir un rôle dans le contrôle du taux de multiplication [82]. Cependant, O'Ríordáin [92] a remarqué que l'addition d' AG_3 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 μM) de BA et 1 mg/l (4,92 μM) 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**

établissement : Ét multiplication : Mu enracinement : En

Température (°C)	Photopériode (heures)	Intensité lumineuse	Références
25	16	15 W/m ²	Adams, 1972
24	16	6 lampes/m ²	Boxus, 1974
28 (Ét)	12-16 (Ét)	1000-1500 lux (Ét)	Boxus <i>et al.</i> , 1977
24 (Mu et En)	16 (Mu et En)	1000-5000 lux (Mu et En)	
25 (jour) 20 (nuit)	12	15 W/m ²	James et Newton, 1977
24	16	4000 lux	Damiano, 1978
22-25	16	2000 lux	Damiano, 1980
26	16	4000 lux (Ét et Mu) 400 à 600 lux (En)	Kartha <i>et al.</i> , 1980
26±1	16	4000 lux	Waithaka <i>et al.</i> , 1980
25	16	1000-2000 lux	Swartz <i>et al.</i> , 1981
22	16	14 W/m ²	Anderson <i>et al.</i> , 1982
23±2	16	4000 lux	Cossio et Menin, 1982
25-27	16	3000 lux	Abramenko, 1983
28	16	4000 lux (Ét) 6000 lux (Mu) 7000 lux (En)	Hunter <i>et al.</i> , 1983, 1984
25	16	1000-3000 lux	Kyte, 1983
25	16	-	Kiernan <i>et al.</i> , 1984
24±2	16	48 µM/m ² /s	Desjardins <i>et al.</i> , 1987
24	16	4000 lux (Ét et Mu) 8000 lux (En)	Hennerty <i>et al.</i> , 1987
23	16	4000 lux	O'Ríordáin, 1987
21	16	2000 lux	Thomsen, 1987
25	16	1000 lux	Malone et Dix, 1990
23±1	16	60 µM/m ² /s	Yue <i>et al.</i> , 1993
26±2	16	62 µM/m ² /s	Nehra <i>et al.</i> , 1992, 1994
23±1	16	62 µM/m ² /s	Hdider et Desjardins, 1994
24±2	16	30-40 µM/m ² /s	Jemmali <i>et al.</i> , 1994
25±1	16	40 µM/m ² /s	López-Aranda <i>et al.</i> , 1994
24±2	16	30-40 µM/m ² /s	Jemmali <i>et al.</i> , 1995

- **Éclairément**

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

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 dégènèrent 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'éclairage, 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 CO₂ 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

- 1 - Abramenko (N.M.) - [A rapid method of strawberry propagation by meristem culture *in vitro*.] (tchèque). - In *Progresívní Smery v Ovocnářské Vyrobě*. Holovousy, Czechoslovakia, 1983, p 209-212. D'après *Hortic. Abstr.* 53(1983)5775.
- 2 - Adams (A.N.) - An improved medium for strawberry meristem culture. - *J. Hortic. Sci.*, 1972, **47**(2), 263-264.
- 3 - Anderson (H.M.) - Strawberry propagation. Field behaviour of tissue culture plants. - *Grower*, 1981, **96**(8), 66,68.
- 4 - Anderson (H.M.), Abbott (A.J.) et Wiltshire (S.) - Micropropagation of strawberry plants *in vitro*- Effect of growth regulators on incidence of multi-apex abnormality. - *Scientia Hortic.*, 1982, **16**(4), 331-341.

- 5 - Antonelli (M.) - La fragola in provetta. - *Inf. Ortofloro-fruttic.*, 1979, **20**(9), 13-16.
- 6 - Atkinson (D.), Crisp (C.M.) et Wiltshire (S.E.) - The effect of medium composition on the subsequent initial performance of micropropagated strawberry plants. - *Acta Hortic.*, 1986, (179), 877-878.
- 7 - Badawi (M.A.), Alphonse (M.), Bondok (A.Z.), Hosni (Y.A.) - Propagation of some strawberry cultivars by means of tissue culture technique. - *Egypt. J. Hortic.*, 1990, **17**(1), 9-16.
- 8 - Bakun (T.V.) - [Features of the microclonal method of propagating strawberries.] (russe). - In *Probl. vegetat. razmnozheniya v sadovod.* Moscou, 1985, p 122-128. D'après *Hortic. Abstr.*, 58(1988)2730.
- 9 - Barceló (M.), El Mansouri (I.), Mercado (J.A.), Quesada (M.A.), Alfaro (F.P.) - Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1998, **54**(1), 29-36.
- 10 - Barceló (M.), López-Aranda (J.M.), Pligo-Alfaro (F.) - Organogenesis en discos de hoja de fresa. - *Acta II Congr. Iberico Cienc. Hortic.*, 1993, 988-992.
- 11 - Battistini (C.), Rosati (P.) - *In vitro* evaluation of somaclonal strawberry (*Fragaria X ananassa* 'Brighton') variants for susceptibility to *Phytophthora cactorum*. - In Dale (A.), Luby (J.J.) *The strawberry into 21st century*. Portland Oregon USA : Timber Press, 1991, p 121-123.
- 12 - Beech (M.G.), Crisp (C.M.), Sipson (S.E.), Atkinson (D.) - The effect of *in vitro* cytokinin concentration on the fruiting and growth of conventionally propagated strawberry runner progeny. - *J. Hortic. Sci.*, 1988, **63**(1), 77-81.
- 13 - Belkengren (R.O.), Miller (P.W.) - Culture of apical meristems of *Fragaria vesca* strawberry plants as a method of excluding latent A virus. - *Plant Dis. Rep.*, 1962, **46**, 119-121.
- 14 - Bhojwani (S.S.), Razdan (M.K.) - *Plant tissue culture : Theory and Practice*. Amsterdam : Elsevier, 1983.
- 15 - Bjurman (B.) - Field performance of Senga Sengana and Zefyr, raised from micropropagated mother plants. - In Boxus (P.), Larvor (P.) *In vitro Culture of Strawberry Plants*. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871. EN-ER*, 1987, 7-9.

- 16 - Bois (D.) - Tribu des Potentillées. - In *Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges*. Histoire, utilisation, culture. Volume II. Phanérogames fruitières. Paris : Paul Lechevalier, 1928, p 239-254.
- 17 - Boxus (P.) - The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. - *J. Hortic. Sci.*, 1974, **49**(3), 209-210.
- 18- Boxus (P.) - La “micropropagation”, procédé industriel de multiplication rapide du fraisier. - *Fruit Belge*, 1977, **378**, 120-128.
- 19 - Boxus (P.) - Commercial production of strawberry plants produced by meristem culture and micropropagation. - In *Les Florales Internationales de Montréal*. Colloques scientifiques, 15, Perspectives de l’horticulture, Arbres Fruitiers et Petits Fruits. *Collection Études et Dossiers de la Documentation Québécoise*, gouvernement du Québec, 1981, p 310-348.
- 20 - Boxus (P.) - Review on strawberry mass propagation. - *Acta Hortic.*, 1989, (265), 309-920.
- 21 - Boxus (P.), Damiano (C.), Brasseur (E.) - Strawberry. - In Ammirato (P.V.), Evans (D.A.), Sharp (W.R.), Yamada (Y.) *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 3, New York : Macmillan, 1984, p 453-486.
- 22 - Boxus (P.), Quoirin (M.), Laine (J.M.) - Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. - *Appl. Fundam. Aspects Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1977, 130-143.
- 23 - Converse (R.H.), Tanne (E.) - Heat therapy and stolon apex culture to eliminate mild yellow-edge virus from hood strawberry. - *Phytopatology*, 1984, **75**(11), 1315-1316.
- 24 - Cossio (F.), Menin (G.) - Micropropagazione della fragola: Confronto tra substrati contenenti differenti miscele di macroelementi. - *Frutticoltura*, 1982, **44**(5), 54-57.
- 25 - Damiano (C.) - La ripresa vegetativa di piantine di fragola provenienti da colture *in vitro*. - *Frutticoltura*, 1977, **39**(2), 3-7.
- 26 - Damiano (C.) - Il carbone attivo nella coltura *in vitro* della fragola. - *Frutticoltura*, 1978, **40**(5), 49-50.
- 27 - Damiano (C.) - Strawberry micropropagation. - In *Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture : Applications and feasibility*. Beltsville, Maryland, USDA-SEA, Agricultural Research Results, ARR-NE-11, 1980, p 11-22.

- 28 - Damiano (C.), Ascarelli (A.), Frattarelli (A.), Lauri (P.) - Adventitious regeneration and genetic variability in strawberry. - *Acta Hortic.*, 1995, (392), 107-114.
- 29 - Damiano (C.), Laneri (U.), Arias (E.J.) - Nota preliminare sull'utilizzazione dell'azoto nitrico de ammoniacale in colture *in vitro* di fragola. - *Ann. Ist. Sper. Fruttic. (Rome)*, 1979, **10**, 35-41.
- 30 - Debergh (P.C.), Maene (L.J.) - A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. - *Scientia Hortic.*, 1981, **14**(4), 335-345.
- 31 - Debergh (P.C.), Read (P.E.) - Micropropagation. - In Debergh (P.C.), Zimmerman (R.H.) *Micropropagation. Technology and application*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1991, p 1-13.
- 32 - Desjardins (Y.), Gosselin (A.), Yelle (S.) - Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1987, **112**(5), 846-851.
- 33 - Donnelly (D.J.), Skelton (F.E.) - Hydathode structure of micropropagated plantlets and greenhouse-grown 'Totem' strawberry plants. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1987, **112**(5), 755-759.
- 34 - Economou (A.S.), Read (P.E.) - Lights treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. - *HortScience*, 1987, **22**(5), 751-754.
- 35 - El Mansouri (I.) - Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Fragaria* spp. y *Lycopersicon esculentum* Mill. - Thèse Doct., Univ. Malaga, Espagne, 1997.
- 36 - Fabbri (A.), Sutter (E.), Dunston (S.K.) - Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. - *Scientia Hortic.*, 1986, **28**(4), 331-337.
- 37 - Gamborg (O.L.), Miller (R.A.), Ojima (K.) - Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. - *Exp. Cell. Res.*, 1968, **50**(1), 151-158.
- 38 - George (E.F.), Sherrington (P.D.) - *Plant propagation by tissue culture*. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Eversley, England : Exegetic Ltd., 1984.
- 39 - Greene (A.E), Davis (T.M.) - Regeneration of *Fragaria vesca* plants from leaf tissue. - In Dale (A.), Luby (J.J.) *The strawberry into 21st century*. Portland Oregon USA : Timber Press, 1991, p 124-125.

- 40 - Grout (B.W.W.) - Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stress of transplanting. - *Acta Hortic.*, 1988, (230), 129-135.
- 41 - Grout (B.W.W.), Millam (S.) - Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. - *Ann. Bot.*, 1985, **55**(1), 129-131.
- 42 - Hammoudeh (H.Y.), Suwwan (M.A.), Abu-Quoud (H.A.), Shibli (R.A.) - Micropropagation and regeneration of 'Honeoye' strawberry. - *Disarat. Agric. Sci.*, 1998, **25**(2), 170-178.
- 43 - Harper (P.C.) - The Scottish strawberry runner certification scheme. - In Boxus (P.), Larvor (P.) *In vitro* culture of strawberry plants. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871 EN-FR*, 1987, 35-38.
- 44 - Harper (P.C.), Fordyce (W.A.), Rankin (P.A.) - Constraints upon the use of micropropagation for the Scottish strawberry certification scheme. - In Withers (L.A.), Alderson (P.G.) *Plant tissue culture and its agricultural applications*. London : Butterworths, 1987, p 205-210.
- 45 - Hdider (C.), Desjardins (Y.) - Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1994, **36**(1), 27-33.
- 46 - Heller (R.) - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. - *Ann. Sci. Nat. Biol. Veg.*, 1953, **14**, 1-223
- 47 - Hennerty (M.J.), Hunter (S.A.), Foxe (M.J.) - Field performance of tissue cultured strawberry plants. - In Boxus (P.), Larvor (P.) *In vitro* culture of strawberry plants. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871 EN-FR*, 1987, 41-46.
- 48 - Hunter (S.A.), Foxe (M.J.), Hennerty (M.J.) - The influence of temperature and light intensity on the *in vitro* propagation of the strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) cv. Cambridge Favourite. - *Acta Hortic.*, 1983, (131), 153-161.
- 49 - Hunter (S.A.), Hannon (M.), Foxe (M.J.), Hennerty (M.J.) - Factors affecting the *in vitro* production of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) meristems (cv. Cambridge Favourite). - *J. Life Sci.*, 1984, **5**, 13-19.
- 50 - Isac (V.), Popescu (A.N.), Coman (M.) - Studies on plant regeneration from tissue-derived callus in *Fragaria X ananassa* Duch. - In Schmidts

- (H.), Kellerhals (M.) *Progress in temperate fruit breeding*, Kluwer Academic Publishers, 1994, p 395-398.
- 51 - James (D.J.), Newton (B.) - Auxin:cytokinin interactions in the *in vitro* micropropagation of strawberry plants. - *Acta Hort.*, 1977, (78 Tissue culture for horticultural purposes), 321-331.
- 52 - Janeckova (M.), Mysliveckova (J.), Havrankova (I.), Capkova (D.) - Comparison of one-year somaclone yields of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) obtained *in vitro* by the regeneration technique from leaf discs and by meristem culture. - *Zahradnictvi*, 1993, **20**(3), 153-162.
- 53 - Jelenkovic (G.), Chin (C.), Billings (S.), Eberhardt (J.) - Transformation studies in cultivated strawberry, *Fragaria X ananassa* Duch. - In Dale (A.), Luby (J.J.), *The strawberry into 21st century*. Portland Oregon USA : Timber Press, 1991, p 91-97.
- 54 - Jemmali (A.), Boxus (P.), Kevers (C.), Gaspar (T.) - Flowering abundance of strawberry depending on the number of subcultures *in vitro*. Relationship with growth, rooting and peroxidase activity. - In Lumsden (P.J.), Nicholas (J.R.), Davies (W.J.) *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1994, p 356-362.
- 55 - Jemmali (A.), Boxus (P.), Kevers (C.), Gaspar (T.) - Carry-over of morphological and biochemical characteristics associated with hyperflowering of micropropagated strawberries. - *J. Plant Physiol.*, 1995, **147**(3-4), 435-440.
- 56 - Jones (O.P.) - Micropropagation of strawberry and temperate fruit trees. - In *Micropropagation in horticulture: Practice and commercial problems*. - *Proc. Inst. Hortic. Symp. University of Nottingham School of Agriculture*, 1987, p 85-96.
- 57 - Jones (O.P.), Waller (B.J.), Beech (M.G.) - The production of strawberry plants from callus cultures. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1988, **12**(2), 235-241.
- 58 - Kartha (K.K.), Leung (N.L.), Pahl (K.) - Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1980, **105**(4), 481-484.
- 59 - Kiernan (J.M.), Hendrix (J.W.), Stoltz (L.P.), Maronek (D.M.) - Characterization of strawberry plants produced by tissue culture and

- infected with specific mycorrhizal fungi. - *HortScience*, 1984, **19**(6), 883-885.
- 60 - Knop (W.) - Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. - *Landwirtsch. Vers. Stn.*, 1965, **7**, 93-107.
- 61 - Kyte (L.) - *Plants from test tubes*. An introduction to micropropagation. Portland, Oregon : Timber Press, 1983.
- 62 - Lee (E.C.M.), De Fossard (R.A.) - Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (*X Fragaria ananassa* Duchesne) *in vitro*. - *Acta Hortic.*, 1977, (78), 187-195.
- 63 - Linsmaier (E.M.), Skoog (F.) - Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant.*, 1965, **18**(1), 100-127.
- 64 - Lis (E.K.) - *In vitro* clonal propagation of strawberry from immature achenes. - *Acta Hortic.*, 1990, (280 *In vitro* culture and horticultural breeding), 147-150.
- 65 - Lis (E.K.) - Strawberry plant regeneration by organogenesis from peduncle and stolon segments. - *Acta Hortic.*, 1993, (348), 435-438.
- 66 - Liu (Z.R.), Sanford (J.C.) - Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. - *HortScience*, 1988, **23**(6), 1057-1059.
- 67 - López-Aranda (J.M.), Pliego-Alfaro (F.), López-Navidad (I.), Barceló-Muñoz (M.) - 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.*, 1994, **69**(4), 625-637.
- 68 - Maliarciková (V.) - [Production of strawberry plants by meristem culture.] (slovaque). - *Ved. Pr. Vyzk. Ustavu Ovocnych Okrasnych Drevin Bojniciach*, 1981, **3**, 109-115. D'après *Hortic. Abstr.* 53(1983)4933.
- 69 - Malone (R.P.), Dix (P.J.) - Mutagenesis and triazine herbicide effects in strawberry shoot cultures. - *J. Exp. Bot.*, 1990, **41**(225), 463-469.
- 70 - Marcotrigiano (M.), Morgan (P.A.), Swartz (H.J.), Ruth (J.) - Histogenic instability in tissue culture-proliferated strawberry plants. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1987, **112**(3), 583-587.
- 71 - Marcotrigiano (M.), Swartz (H.J.), Gray (S.E.), Tokarcik (D.), Popenoe (J.) - The effect of benzylamino purine on the *in vitro* multiplication rate and subsequent field performance of tissue-culture

- propagated strawberry plants. - *Adv. Strawberry Prod.*, 1984, **3**, 23-25.
- 72 - Margara (J.) - *Bases de la multiplication végétative*. Versailles, Paris : INRA, 1984, 262 p.
- 73 - Mc Grew (J.R.) - Meristem culture for production of virus-free strawberries. - *Proceeding on the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture. Application and feasibility. Beltsville, Maryland*, 1980, 80-85.
- 74 - Merkle (S.) - Yield and other quantitative characters of strawberry plants micropropagated on media with different phytohormone contents. - *Acta Hort.*, 1993, (348), 403-413.
- 75 - Miller (A.R.), Chandler (C.K.) - Plant regeneration from excised cotyledons of mature strawberry achenes. - *HortScience*, 1990, **25**(5), 569-571.
- 76 - Mohamed (F.), Swartz (H.J.), Buta (J.G.) - The role of abscisic acid and plant growth regulators in tissue culture-induced rejuvenation of strawberry *ex vitro*. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1991, **25**(1), 75-84.
- 77 - Moore (P.P.), Robbins (J.A.), Sjulín (T.M.) - Field performance of 'Olympus' strawberry subclones. - *HortScience*, 1991, **26**(2), 192-194.
- 78 - Mullin (R.H.), Schlegel (D.E.) - Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. - *HortScience*, 1976, **11**(2), 100-101.
- 79 - Mullin (R.H.), Smith (S.H.), Frazier (N.W.), Schlegel (D.E.), Mc Call (S.R.) - Meristem culture frees strawberries of mild yellow edge, pallidosis and mottle diseases. - *Phytopathology*, 1974, **64**(11), 1425-1429.
- 80 - Murashige (T.) - Plant propagation through tissue cultures. - *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1974, **25**, 135-136.
- 81 - Murashige (T.), Skoog (F.) - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant.*, 1962, **15**(3), 473-497.
- 82 - Navatel (J.C.) - La multiplication *in vitro* du fraisier. Un nouveau schéma de production de plants de fraisier. - *CTIFL-Documents*, 1979, **60**, 53-63.
- 83 - Navatel (J.C.) - La production des plants du fraisier en France. - *CTIFL-Documents*, 1983, **77**, 12-16.

- 84 - Nehra (N.S.), Chibbar (R.N.), Kartha (K.K.), Datla (R.S.S.), Crosby (W.L.), Stushnoff (C.) - *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. - *Plant Cell Rep.*, 1990a, **9**(1), 10-13.
- 85 - Nehra (N.S.), Chibbar (R.N.), Kartha (K.K.), Datla (R.S.S.), Crosby (W.L.), Stushnoff (C.) - Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. - *Plant Cell Rep.*, 1990b, **9**(6), 293-298.
- 86 - Nehra (N.S.), Kartha (K.K.), Stushnoff (C.), Giles (K.L.) - The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1992, **29**(3), 257-268.
- 87 - Nehra (N.S.), Kartha (K.K.), Stushnoff (C.), Giles (K.L.) - Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. - *Euphytica*, 1994, **76**(1-2), 107-115.
- 88 - Nehra (N.S.), Stushnoff (C.), Kartha (K.K.) - Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1989, **114**(6), 1014-1018.
- 89 - Nishi (S.), Ohsawa (K.) - Mass production method of virus-free strawberry plants through meristem callus. - *Jpn. Agric. Res. Q.*, 1973, **7**(3), 189-194.
- 90 - Nyman (M.), Wallin (A.) - Improved culture technique for strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) protoplasts and the determination of DNA content in protoplast derived plants. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1992, **30**(2), 127-133.
- 91 - Oertel (C.) - Zur Effektivität der Wärmebehaltung bei der Virusfreimachung von Zierpflanzen und Erdbeeren. - *Archiv. Gartenbau*, 1981, **29**(5), 217-231.
- 92 - O'Ríordáin (F.) - The effects of benzyladenine, indole butyric acid and gibberellic acid on the micropropagation of the strawberry cultivar 'Clonard'. - In Boxus (P.) Larvor (P.) *In vitro* Culture of Strawberry Plants. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871. EN-ER*, 1987, 47-53.
- 93 - Pennell (D.) - Strawberry review : Micropropagation, the pros and cons. - *Grower*, 1981, **95**(17), 58-62.

- 94 - Pennell (D.) - Strawberry micropropagation within the UK. - In Boxus (P.), Larvor (P.) *In vitro* Culture of Strawberry Plants. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871. EN-ER*, 1987, 27-34.
- 95 - Petrovic (D.), Jacimovic-Plavsic (M.) - Propagation of the strawberry cultivar senga sengana by *in vitro* meristem culture. - *Nauka Praksi (Bihac)*, 1990, **20**(1), 11-18.
- 96 - Phillips (R.), Arnott (S.M.), Kaplan (S.E.) - 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.*, 1981, **21**(3), 235-240.
- 97 - Pierik (R.L.M.) - Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. - In Debergh (P.C.), Zimmerman (R.H.) *Micropropagation. Technology and application*. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1987, p 155-165.
- 98 - Popescu (A.N.), Isac (V.S.), Coman (M.S.), Radulescu (M.S.) - Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus culture of strawberry (*Fragaria X ananassa*). - *Acta Hort.*, 1997, (439-1), 89-96.
- 99 - Predieri (S.), Malavasi (F.F.F.), Ancherani (M.) - Regeneration of plants from strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) unpollinated ovaries and petals. - *Acta Hort.*, 1989, (265), 335-342.
- 100 - Preece (J.E.), Sutter (E.G.) - Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. - In Debergh (P.C.), Zimmerman (R.H.) *Micropropagation. Technology and Application*. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1991, p 71-93.
- 101 - Preininger (E.), Zatyko (J.), Szucs (P.), Koranyi (P.), Gyurjan (I.) - *In vitro* establishment of nitrogen-fixing strawberry (*Fragaria X ananassa*) via artificial symbiosis with *Azomonas insignis*. - *In Vitro Cell. Dev. Biol. : Plant*, 1997, **33**(3), 190-194.
- 102 - Quarta (R.), Nati (D.), Paoloni (F.M.) - Strawberry anther culture. - *Acta Hort.*, 1992, (300), 335-339.
- 103 - Rancillac (M.), Nourrisseau (J.G.) - Micropropagation and strawberry plant quality. - *Acta Hort.*, 1989, (265), 343-348.
- 104 - Rancillac (M.), Nourrisseau (J.G.), Navatel (J.C.), Roudeillac (P.) - Incidence de la multiplication *in vitro* sur le comportement du plant de fraisier en France. - In Boxus (P.), Larvor (P.) *In Vitro* Culture of

- Strawberry Plants. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871. EN-ER*, 1987, 55-73.
- 105 - Rosati (P.), Devreux (M.), Laneri (U.) - Anther culture of strawberry. - *HortScience*, 1975, **10**(2), 119-120.
- 106 - Rugini (E.), Orlando (R.) - High efficiency shoot regeneration from calluses of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) stipules of *in vitro* shoot cultures. - *J. Hortic. Sci.*, 1992, **67**(4), 577-582.
- 107- Shoemaker (N.P.), Swartz (H.J.), Galletta (G.J.) - Cultivar dependent variation in pathogen resistance due to tissue culture propagation of strawberries. - *HortScience*, 1985, **20**(2), 253-254.
- 108 - Simpson (D.W.), Bell (J.A.) - The response of different genotypes of *Fragaria X ananassa* and their seedling progenies to *in vitro* micropropagation and the effects of varying the concentration of 6-benzylaminopurine in the proliferation medium. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1989, **17**(2), 225-234.
- 109 - Skirvin (R.M.) - Fruit crops. - In Conger (B.V.) *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. West Lafayette, Indiana : Purdue Univ. Press, 1981, p 51-139.
- 110 - Sorvari (S.), Ulvinen (S.), Hietaranta (T.), Hiirsalmi (H.) - Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. - *HortScience*, 1993, **28**(1), 55-57.
- 111 - Sutter (E.), Langhans (R.W.) - Epiticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1979, **104**(4), 493-496.
- 112 - Sutton (B.), Paterson (A.) - Strawberry tissue culture propagation. - *N. Z. Commer. Grower*, 1980, **35**(2), 25-24.
- 113 - Svensson (M.), Johansson (L.B.) - Anther culture of *Fragaria X ananassa* : Environmental factors and medium components affecting microspore divisions and callus production. - *J. Hortic. Sci.*, 1994, **69**(3), 417-426.
- 114 - Swartz (H.J.), Galletta (G.J.), Zimmerman (R.H.) - Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1981, **106**(5), 667-673.
- 115 - Swartz (H.J.), Lindstrom (J.T.) - Small fruit and grape tissue culture from 1980 to 1985 : Commercialization of the technique. - In Zimmerman (R.H.) *et al. Tissue culture as a plant production*

- system for horticultural crops*. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers, 1986, p 201-220.
- 116 - Swartz (H.J.), Lindstrom (J.T.), Fiola (J.A.) - The use of tissue culture propagation of strawberry in the United States. - In Boxus (P.), Larvor (P.) *In Vitro Culture of Strawberry Plants*. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871. EN-ER*, 1987, 79-100.
- 117- Theiler-Hedtrich (R.) - Virus eradication from *Fragaria vesca* by meristem cultures ; preliminary results. - In Boxus (P.), Larvor (P.) *In Vitro Culture of Strawberry Plants*. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871. EN-ER*, 1987, 21-26.
- 118- Thomsen (A.) - Virus-free strawberry by meristem culture in Denmark. - In Boxus (P.), Larvor (P.) *In Vitro Culture of Strawberry Plants*. - *Comm. Eur. Communities, Rep. EUR 10871. EN-ER*, 1987, 39-40.
- 119 - Torres (K.C.) - Tissue culture of strawberry (*Fragaria*). - In *Tissue culture techniques for horticultural crops*, New York : Avi, 1989, p 96-101.
- 120 - Vine (S.J.) - Improved culture of apical tissues for production of virus-free strawberries. - *J. Hortic. Sci.*, 1968, **43**(3), 293-297.
- 121 - Waithaka (K.), Hildebrandt (A.C.), Dana (M.N.) - Hormonal control of strawberry axillary bud development *in vitro*. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1980, **105**(3), 428-430.
- 122 - Wang (D.), Wergin (W.P.), Zimmerman (R.H.) - Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. - *HortScience*, 1984, **19**(1), 71-72.
- 123 - Wetmore (R.H.), Sorokin (S.) - On the differentiation of xylem. - *J. Arnold Arbor.*, 1955, **36**, 305-317.
- 124 - White (P.R.) - *The cultivation of animal and plant cells*. Ronald Press, 1963, 239 p.
- 125 - Yue (D.), Gosselin (A.), Desjardins (Y.) - Re-examination of the photosynthetic capacity of *in vitro*-cultured strawberry plantlets. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1993, **118**(3), 419-424.
- 126 - Zuccherelli (G.) - Tecniche di propagazione industriale delle piantine di fragola da coltura *in vitro* per il vivaio. - In Sansavini (S.) *Societa Orticola Italiane Incontro Nazionale Sulla Coltura della Fragola*. S.O.I. Ferrara, 1979, p 169-178.

ABSTRACT

***In vitro* regeneration of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) I Different stages of micropropagation**

Since the description by Boxus and al. in 1977 of a process for regeneration of millions of strawberry plantlets from one meristem, this mass production has been adopted around the world and has been modified, improved and adopted to various cultivars.

Works upon strawberry micropropagation are reviewed and different mediums and culture conditions are displayed.

Key-words : *Fragaria X ananassa*, *in vitro* culture, micropropagation, strawberry.
