



Schweizerische Kommission für die Erhaltung von Kulturpflanzen
Commission suisse pour la conservation des plantes cultivées
Commissione svizzera per la conservazione delle piante coltivate

Rapport final 2010

Collection *in vitro* PAN 03-88



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra



Schweizerische Kommission für die Erhaltung von Kulturpflanzen
Commission suisse pour la conservation des plantes cultivées
Commissione svizzera per la conservazione delle piante coltivate

Table des matières:

1. Introduction.....	3
2. Maintien <i>in vitro</i> et caractérisation génétique (SSR) des baies :.....	3
3. Installation <i>in vitro</i> du matériel:.....	3
4. Assainissement	3
5. Importation des données dans la BDN.....	3
6. Remerciements	3
7. Conservation et assainissement des fraises, framboises et mûres (C.-L. Lê)	4



Schweizerische Kommission für die Erhaltung von Kulturpflanzen
Commission suisse pour la conservation des plantes cultivées
Commissione svizzera per la conservazione delle piante coltivate

1. Introduction

Selon le concept pour la conservation et l'utilisation durable des ressources phylogénétiques en Suisse, les fraises, framboises et mûres sont conservées en culture *in vitro* dans la collection primaire. La Commission suisse pour la conservation des plantes cultivées (CPC) exécute en étroite collaboration avec le groupe Biotechnologie Végétale de la station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW ce projet. Les personnes responsables de ce projet sont C.-L. Lê pour ACW et Christoph Köhler pour le secrétariat de la CPC.

2. Maintien *in vitro* et caractérisation génétique (SSR) des baies :

Au 31.12.2010, 100 accessions de fraises, mûres et framboises sont maintenues de manière *in vitro* dans le conservatoire de l'ACW-Changins selon le concept et directives des baies 2006. Le résultat est un peu en dessous des objectifs fixés par le projet (115 accessions conservées). Les détails techniques sont développés dans le rapport ci-joint (chapitre 7).

Les accessions de fraises, framboises et mûres conservées dans la collection *in vitro* ont été caractérisées avec des marqueurs moléculaires. Toutefois, l'étude avec de nouveaux microsatellites ainsi que l'analyse d'un plus grand nombre d'accessions sont nécessaires afin de fiabiliser les résultats. Ce travail va se poursuivre lors de la phase IV.

3. Installation *in vitro* du matériel:

Durant la période, 20 accessions de fraisiers, 35 accessions de framboises et 6 accessions de mûres ont été introduites dans le laboratoire *in vitro*. Les détails techniques sont développés dans le rapport ci-joint (chapitre 7).

4. Assainissement

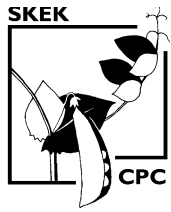
L'assainissement des anciennes variétés de baies est un processus relativement complexe, puisque le matériel en provenance de la collection d'introduction ou de la collection de Conthey (multiplication) est souvent d'une vitalité très faible et ne permet pas de faire des rejets, nécessaire pour l'assainissement. Ainsi, uniquement une dizaine d'accession a pu être assainies au lieu des 50 planifiées. Ce travail va se poursuivre lors de la phase IV

5. Importation des données dans la BDN

La collection *in vitro* des petits fruits a pu être mises à jour.

6. Remerciements

La CPC tient à remercier vivement l'OFAG pour sa confiance ainsi que pour son soutien financier.



**Schweizerische Kommission für die Erhaltung von Kulturpflanzen
Commission suisse pour la conservation des plantes cultivées
Commissione svizzera per la conservazione delle piante coltivate**

7. Conservation et assainissement des fraises, framboises et mûres (C.-L. Lê)

Rapport annuel | 4 février 2011

Rapport final 2007-2011

Conservation *in vitro* des baies et
petits fruits (NAP 03 – 88)

Dr Lê – công – Linh
Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil
ACW

Table des matières

1. Collection <i>in vitro</i>	3
2. Nouvelles introductions.....	3
3. Assainissement.....	3
4. Comportement <i>in vitro</i>	5
5. Conservation de longue durée.....	5
6. Fourniture de matériel.....	6
7. Caractérisation.....	7
8. Remerciements.....	7

1. Collection *in vitro*

A la fin de la période 2007- 2010, le conservatoire *in vitro* de la station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW possède une centaine (100) d'accessions de baies et petits fruits qui sont conservés sous forme de microplantes *in vitro*, dont cinquante neuf (59) de fraisier et quarante et une (41) du groupe framboisier et mûrier (fig. 1).



Fig. 1. Vue de la collection des accessions de fraisier conservées *in vitro*.

2. Nouvelles introductions

L'introduction des nouvelles accessions de baies et petits fruits durant la période écoulée s'élève à vingt (20) accessions pour le fraisier, trente (35) pour le framboisier et six (6) pour la mûre (tabl.1).

Tableau 1. Accessions de fraisier, de framboisier et de mûre nouvellement introduites au conservatoire.

Fraisier

BE-440	Vicomtesse Héricart de Thury
BE-331	Erdbeere von Merzligen
BE-686	Corma-60
BE-692	Sorma-59
BE-533	May Queen
BE-439	Laxton's noble
BE-538	Erdbeere von Windisch
BE-688	Cortisor 52
BE-12	Erdbeere von Basel
BE-445	Erdbeere von Turbach
BE-332	Erbeere von Tagelswangen
BE-304	Erdbeere von Sachseln
BE-458	Erdbeere von Blankenburg
BE-633	Erdbeere von Biel
BE-730	Gorella
BE-748	Erdbeere von Schaffhausen
BE-549	Weisse Monatserdbeere von Ogens

BE-2	Erdbeere von Praz-de-Fort
BE-16	Erdbeere von Riehen
BE-450	Erdbeere von Saanen

Framboisier

BE-254	Indian Summer
BE-253	Deutschland
BE-255	Lloyd George
BE-280	Andenken an Paul Camenzind
BE-820	Zeva 1
BE-821	Zeva 2
BE-819	Ambition (DH-94)
BE-354	Kolberg's Ruhm
BE-426	Rote Himbeere von Rüti
BE-47	Rote Himbeere von safnern
BE-572	Perpétuelle de Billard
BE-571	Preussen
BE-49	Gelbe Himbeere von Oberwil
BE-42	Rote Himbeere von Carouge
BE-827	Zeva Herbsternte (Z-III)
BE-34	Winklers Sämling
BE-618	Rote Himbeere von Muri
BE-221	Gelbe Antwerpener
BE-28	Mattehorn
BE-25	Rote Himbeere von Basel
Be-26	Malling Exploit
BE-35	Rote Himbeere von Stallikon
BE-45	Rote Himbeere von Binningen
BE-58	Unbekannt
BE-320	Gelbe Himbeere von Lohn
BE-229	Bristol
BE-267	Rote Himbeere von Luzern
BE-627	Rote Himbeere von Zürich
BE-300	Rote Himbeere von Richterswil
BE-371	Rote Himbeere von Basel
BE-357	Rote Himbeere von Aegerten
BE-382	Gelbe Himbeere von Schmitten
BE-383	Rote Himbeere von Schmitten
BE-480	Rote Himbeere von Boltigen
BE-615	Rote Himbeere von Laupersdorf

Mûre

BE-56	Farnblättrige
BE-222	Kittatinny
BE-225	Taylor's Fruchtbare
BE-226	Wilson's Early
BE-353	Shaffers Colossal
BE-32	Schönemann

A propos de nouvelles introductions dans le conservatoire *in vitro*, il est à noter que certaines accessions fournies au départ de notre projet PAN pour initialiser les cultures *in vitro*, sont difficiles à manipuler, cela en raison de leur inaptitude de former des structures stolonifères et d'assurer ainsi un bon

développement de l'appareil végétatif. Cette situation est due, selon nos constatations, à un déséquilibre physiologique (maladies, nutrition inadéquate ?) trouvé sur des cultures de la collection primaire, nécessitant une longue période de mise en place du matériel poussant. Ce fait retarde, par conséquent, l'établissement du matériel de base destiné aux travaux de reproduction et de régénération *in vitro*.

3. Assainissement

A l'exception des accessions de baies et petits fruits qui ne se révèlent pas être contaminées par des pathogènes, notamment des virus, lors de leur introduction dans la collection *in vitro*, d'autres ont dû être assainies en recourant à la technique de régénération par culture de méristèmes (tabl. 2).

Tableau 2. Accessions de baies et petits fruits devant subir un assainissement en raison de la présence des pathogènes viraux.

Génotypes	Pathogènes
<i>Fraisier</i>	
BE-2	SMYEPV
BE-16	SMYEPV
BE-304	SMYEPV
BE-332	SMYEPV
BE-450	SMYEPV
BE-445	SMYEPV
BE-458	SMYEPV
BE-549	SMYEPV
BE-633	SMYEPV
BE-730	SMYEPV
<i>Framboisier</i>	
BE-25	<i>RpRSV</i>
BE-28	<i>RpRSV</i>
BE-35	<i>RpRSV</i>
BE-229	<i>RpRSV</i>
BE-255	<i>RBDV</i>
BE-371	<i>RBDV</i>

L'assainissement proprement dit comporte d'abord la préparation de matériel sous forme de microplantules *in vitro*, ensuite l'extraction des méristèmes suivie de la régénération de mériplantules sur un milieu de culture

approprié. Lors de la phase de préparation de matériel initial, il apparaît que certains génotypes ont des difficultés à s'adapter au nouveau milieu de culture ou ne pas former d'organes de reproduction nécessaires. Ce fait constitue, par conséquent, un retard important dans les travaux de guérison des accessions gravement atteintes de viroses. Aussi, des interventions pressantes, telle que la reproduction accélérée au niveau du matériel de base, ont-elles été initiées au cours de cette période écoulée, cela afin de nous permettre de réaliser les travaux d'assainissement dans les conditions adéquates *in vitro*. Une dizaine d'accessions ont pu ainsi être menées à bien dans le processus de guérison des maladies causées par des pathogènes viraux.

4. Comportement *in vitro* des framboisiers

Lors de l'établissement *in vitro* des génotypes de baies et petits fruits, il s'est révélé que pour certaines accessions, en particulier celles du framboisier, la reprise de croissance en conditions de milieu artificiel demeure encore une difficulté majeure. De nombreux essais ont été réalisés afin d'améliorer leur aptitude à se développer, cela en regard de la nature du matériel initial, ainsi que des conditions de culture dans lesquelles évoluent les microplantules.

Les constatations sur le comportement du framboisier à l'installation *in vitro* sont les suivantes :

- les explants de la région centrale de la tige ont une capacité de croissance visiblement importante, en comparaison avec ceux des parties sommitale et basale, qui laissent apparaître une reprise de croissance faible voire nulle. Ce grand pouvoir de développement observé sur les explants du centre par rapport à ceux des parties extrêmes nous laisse suggérer l'existence, à l'origine, d'une répartition différentielle de substances de croissance sur le matériel initial, qui

pourrait être responsable de ces différents comportements.

- Une forte intensité d'éclairement (100 $\mu\text{mole.m}^2.\text{sec}$) provoque des modifications importantes sur la microplante, par exemple :

- feuillage décoloré
- folioles réduites
- pigmentations
- dépérissement des apex

- Une intensité d'éclairement réduite (35 $\mu\text{mole.m}^2.\text{sec}$) permet à la microplante de se développer avec un feuillage normalement coloré. Le dépérissement des apex de tige diminue visiblement pour laisser la place à une croissance, semble-t-il, normale.

5. Conservation de longue durée

Des essais visant à augmenter la durée de conservation du matériel *in vitro* en parfait état sanitaire, ont été réalisés avec des microboutures et des microbilles (semences artificielles).

Les premières tentatives faites avec du matériel fraîchement repiqué sous forme de microboutures montrent que les accessions testées ont manifestement survécu et recouvert sans aucune difficulté particulière leur croissance après un séjour de 16 mois à +4°C (tabl. 3)

Tableau 3. Liste des accessions de fraisier ayant survécu après une période de conservation de 16 mois, à + 4°C.

Génotypes	Durée	Reviviscence
BE-257	16 mois	+
BE-429	16 mois	+
BE-435	16 mois	+
BE-439	16 mois	+
BE-459	16 mois	+
BE-686	16 mois	+
BE-688	16 mois	+

En nous basant sur les résultats acquis en regard du recouvrement des

fonctions physiologiques de manière intacte sur des microplantes *in vitro*, nous avons donc poursuivi les travaux de conservation en étendant cette possibilité de préservation jusqu'à 24 mois (tabl. 4).

Tableau 4. Liste des accessions de fraisier ayant survécu après une période de conservation de 24 mois, à + 4°C.

Génotypes	Durée	Reviviscence
BE-7	24 mois	+
BE-21	24 mois	+
BE-242	24 mois	+
BE-257	24 mois	+
BE-429	24 mois	+
BE-435	24 mois	+
BE-439	24 mois	+
BE-459	24 mois	+
BE-686	24 mois	+
BE-688	24 mois	+

Au terme de la période de conservation, le matériel végétal expérimenté est transféré dans les conditions normales de culture pour réactiver sa croissance longtemps mise au ralenti. Toutes les accessions ainsi expérimentées ont bien recouvert leur capacité de croissance après une dizaine de jours de culture (figures 2 et 3).



Figure 2. Microbouture de fraisier BE-242 installée *in vitro* pour une conservation de 24 mois à +4°C.



Figure 3. Reprise de croissance du génotype de fraisier BE-242 conservé sous forme de micoboutures pendant 24 mois à +4°C.

De même, les accessions de fraisier maintenues sous forme de microbilles (ou semences artificielles) ont pu également être conservées pendant une période allant de 12 à 24 mois, dépendant des génotypes expérimentés (fig. 4 et tabl. 5),

Tableau 5. Liste des accessions de fraisier conservées sous forme de microbilles à +4°C.

Génotypes	Matériel	Durée
BE-7	Microbilles	24 mois
BE-21	Microbilles	21 mois
BE-435	Microbilles	16 mois
BE-429	Microbilles	16 mois
BE-242	Microbilles	12 mois

Par ailleurs, il est important de relever aussi le comportement des plantes issues de microbilles au retour dans les conditions normales de culture. On note à cet égard une forte croissance chez ce matériel avec le développement de nouvelles pousses apparues sur la microplante (fig. 5). Cette vigueur observée sur les microbilles semble être due à la manière dont on prépare le matériel à conserver : l'enrobage du méristème axillaire, organe de conservation, dans une matrice protectrice riche en matière nutritive, à l'instar d'une vraie semence, aurait permis, semble-t-il, une bonne protection durant la conservation à basse température, et une rapide reprise de croissance lorsque les conditions environnementales redeviennent

normales. Cette possibilité de conservation constitue un complément de moyen de stockage des ressources génétiques des baies et petits fruits, avec un avantage de réduire encore de plusieurs fois le volume de matériel nécessaire pour le conservatoire *in vitro*.



Figure 4. Microbille de fraisier BE-7 préparée pour une conservation pendant 24 mois à +4°C.



Figure 5. Reviviscence du génotype de fraisier BE-7 conservé sous forme de microbille pendant 24 mois à +4°C.

6. Fourniture de matériel

Au cours de la période écoulée, l'utilisation des ressources génétiques des baies et petits fruits a pu se concrétiser par la mise à la disposition des demandeurs du matériel de haute qualité sanitaire. Les génotypes demandés sont livrés sous forme de jeunes plants sevrés prêts à être transférés à l'extérieur pour poursuivre leur cycle de croissance et de développement en conditions de culture conventionnelles (tabl. 6).

Tableau 6. Liste des accessions de framboisier fournies durant la période 2007-2010.

Génotypes	Etat sanitaire	Année
BE-32	sain	2008
BE-42	sain	2008
BE-47	sain	2008
BE-49	sain	2008
BE-56	sain	2008
BE-255	sain	2008
BE-267	sain	2008
BE-353	sain	2008
BE-354	sain	2008
BE-572	sain	2008
BE-819	sain	2008
BE-820	sain	2008
BE-26	sain	2010
BE-255	sain	2010
BE-820	sain	2010
BE-821	sain	2010

7. Caractérisation

Aucune nouvelle accession de petits fruits n'a été reçue. La mise au point de marqueurs moléculaires supplémentaires se poursuit.

3 nouveaux microsatellites ont été ajoutés à celui déjà utilisé pour les fraises. Sur les 61 accessions testées, 14 étaient soupçonnées d'être des doublons, avec les 3 marqueurs supplémentaires, c'est seulement 2 accessions qui restent suspects.

2 nouveaux microsatellites ont été ajoutés aux 5 déjà utilisés pour les Rubus. Parmi les 41 accessions testées, 6 doublons suspects subsistent parmi les 7 détectés précédemment.

Les fraises, majoritairement octoploïdes sont plus facilement différenciables avec un plus petit nombre de marqueurs que les Rubus di ou tétraploïdes.

Dans les deux cas, l'augmentation du nombre d'accessions testées serait bénéfique, ainsi que l'augmentation du nombre de microsatellites.

Des essais préliminaires avec des microsatellites pour les Ribes ont été effectués. Parmi les 6 testés, 3 d'entre eux pourraient s'avérer utiles pour caractériser les raisinets, cassis et groseilles. Le travail de mise au point se poursuit.

8. Remerciements

A la fin de cette troisième phase du plan d'action national pour la conservation et l'exploitation durable des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture (PAN/RPGAA), nous désirons remercier l'Office Fédérale de l'Agriculture (OFAG) pour l'aide financière indispensable à la réalisation des travaux de conservation *in vitro*. Nous adressons également nos remerciements à la direction de la station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW pour nous avoir encouragé à participer à ce projet qui représente un grand intérêt pour la Biodiversité en Suisse. Nous remercions vivement tous les membres de la Commission suisse pour la conservation des plantes cultivées (CPC) pour leur confiance et pour leurs conseils avisés. Nos remerciements vont aussi à Pro Specie Rara (PSR) et aux collègues de la station de Recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW pour leur précieuse collaboration à ce projet NAP (03-88).

Changins, le vendredi 4 février 2011

Dr. Lê-công-Linh
Groupe Biotechnologie Végétale