

Rapport annuel 2009

Collection *in vitro*
PAN 03-88



Vielfalt in der Landwirtschaft



AKTION PFLANZEN

Ein Programm
des Bundesamtes für Landwirtschaft



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)	5



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 31.12.2009, 94 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. Les détails techniques sont développés dans le rapport ci-joint.

6 marqueurs pour les accessions du genre *Rubus* ont permis d'identifier 27 accessions sur 42. D'autres marqueurs moléculaires sont en cours d'évaluation et permettront certainement d'identifier l'ensemble des accessions du genre *Rubus* (Framboise et mûres) conservées dans le conservatoire d'ACW. Pour l'instant, un seul marqueur a été testé pour les fraises. Lors de la séance du groupe de travail, il a été décidé de concentrer en priorité sur l'identification des accessions du genre "*Rubus*" et de se focaliser par la suite sur les fraises.

3. Installation *in vitro* du matériel:

13 nouvelles accessions de la liste positive ont été installées dans le conservatoire *in vitro*. Les détails techniques sont développés dans le rapport ci-joint. Il reste environ 25 accessions à installer afin de conserver l'ensemble des variétés présentes sur les listes positives.

4. Assainissement

L'assainissement des anciennes variétés de baies est un processus relativement complexe, puisque le matériel en provenance de la collection d'introduction est souvent d'une vitalité très faible et ne permet pas de faire des rejets, nécessaire pour l'assainissement. A ce jour une dizaine d'accessions sont assainies. Compte tenus des circonstances, le projet prévoit d'assainir au maximum 20 variétés jusqu'à la fin de la phase III au lieu des 50 planifiées.

5. Importation des données dans la BDN

Les nouvelles accessions ont été importées et les accessions existantes ont été 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



**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 | 5 février 2010

Rapport 2009

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. Situation générale.....	3
2. Assainissement <i>in vitro</i>	3
3. Comportement des framboisiers.....	3
• Effet du niveau d'insertion.....	3
• Effet de l'éclairement.....	4
4. Conservation.....	5
5. Caractérisation.....	5

1. Situation générale

Au cours de l'année 2009, le conservatoire *in vitro* ACW a ajouté dans sa collection douze nouvelles accessions de baies et petits fruits, dont quatre (4) de fraisier et neuf (9) de rubus (framboisier et mûre). Au total, nous avons enregistré nonante quatre (94) accessions qui sont conservées sous forme de microplantes *in vitro*.

2. Assainissement *in vitro*

Les travaux d'établissement *in vitro* du matériel initial contaminé de pathogènes viraux (SMYEPV, RpRSV et RBDV) ont été réalisés pour l'assainissement des géotypes de fraisier et de framboisier suivants :

Géotypes	Pathogènes		
	<u>SMYEPV</u>	<u>RpRSV</u>	<u>RBDV</u>
<i>Fraisier</i>			
BE-332	+		
BE-445	+		
BE-458	+		
BE-549	+		
<i>Framboisier</i>			
BE-25		+	
BE-28		+	
BE-229		+	
BE-371			+

Les premières lignées de plantes établies *in vitro* sont en phase de reproduction accélérée, afin de servir de matériel de base pour les travaux de thérapie et de régénération par culture de méristèmes.

3. Comportement des framboisiers

Lors de l'installation des géotypes de framboisier *in vitro*, il apparaît que certaines accessions ont des difficultés pour reprendre leur croissance, notamment les accessions BE-25, BE-28 et BE-229. Aussi, des essais ont été

réalisés afin d'améliorer leur capacité de croissance en regard du niveau d'insertion des explants initiaux, et des conditions de l'environnement physique de culture.

• Effet du niveau d'insertion des explants

Après avoir été désinfecté en surface, les explants initiaux, comportant chacun un bourgeon axillaire, sont prélevés sur la pousse feuillée en croissance active, tout en respectant leur niveau d'insertion sur celle-ci: *haut*, *milieu* et *bas*. Ils sont ensuite placés sur le milieu de base et transférés dans un environnement de culture où ils reçoivent une photopériode de 16 h. avec un éclairage de 55 $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$. et une température de 20 °C.

Après un mois de culture (installation), on relève le taux de reprise des bourgeons axillaires et leur potentiel de croissance. A cet égard, on remarque que les explants de la partie du milieu ont une reprise de croissance fortement marquée, suivie de ceux des régions distale (*haut*) et proximale (*bas*), qui accusent un retard de croissance considérable (tabl.1). Le constat est le même pour les accessions testées avec, toutefois, une différence en amplitude.

En termes de potentiel de croissance, on relève dans ces essais une remarquable capacité de développement des bourgeons du rang milieu par rapport à ceux des extrémités (figure 1.). Ceci nous suggère qu'une répartition différentielle de substances de croissance de type hormonal, allant de la partie distale (*haut*) à la partie proximale (*bas*) de la pousse feuillée, pourrait être à l'origine des différentes réponses morphogénétiques. Le choix de l'explant initial joue donc un rôle important dans l'obtention d'une réponse morphogénétique adéquate à la reprise de croissance et doit, par conséquent, être pris en considération lors de l'établissement *in vitro* du matériel.

Tableau 1. Reprise de croissance des explants initiaux à différents niveaux d'insertion.

Clones	Niveau	Reprise [%]
BE – 25	Haut	85
	Milieu	100
	Bas	70
BE – 229	Haut	33
	Milieu	50
	Bas	40

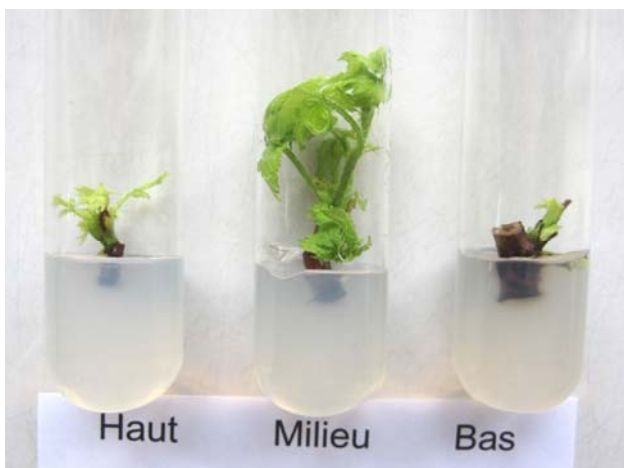


Fig. 1. Reprise de croissance des explants selon le niveau d'insertion sur la pousse feuillée.

- Effet de l'éclaircissement

Les explants initiaux transférés sur un milieu de multiplication, à l'issue de leur établissement, n'arrivent souvent pas à poursuivre leur cycle de développement. L'appareil végétatif développé lors de la culture perd sa pigmentation et se décolore rapidement à la lumière. Ce phénomène nous a obligé à examiner les conditions d'éclairage des cultures. Aussi, des essais à deux différentes intensités lumineuses ont été conduits avec les clones présentant des anomalies morphogénétiques, à savoir :

a. Culture à forte intensité lumineuse

Des microboutures exposées à une intensité d'éclaircissement de 100 $\mu\text{mole.m}^2.\text{sec}$ ont montré, après un cycle de culture d'un mois, des anomalies morphogénétiques notables (fig. 2) telles que :

- décoloration totale du feuillage;
- diminution de la taille des folioles;
- apparition de l'anthocyane;
- nécrose de la pousse feuillée.



Fig. 2. Microplante de framboisier cultivée sous un régime de forte intensité lumineuse.

b. Culture à faible intensité lumineuse

A un éclaircissement réduit de 35 $\mu\text{mole.m}^2.\text{sec}$, les microboutures de framboisier s'avèrent être moins stressées quant à leur réaction morphogénétique (fig. 3). On remarque que le système foliaire se développe normalement avec une coloration allant du vert-clair au vert foncé. La nécrose des tiges a apparemment disparu pour laisser la place à une croissance, semble-t-il, normale.

L'effet néfaste d'une forte intensité sur le comportement inhabituel des framboisiers dans le cas présent pourrait être atténué par la réduction de la quantité d'énergie apportée au cours de leur culture à un seuil de 35 $\mu\text{mole.m}^2.\text{sec}$ environ.



Fig. 3. Microplante de framboisier cultivée sous un régime de faible intensité lumineuse.



Figure 4. Reviviscence des microbilles préparées avec une seule enveloppe protectrice (à gauche) et deux enveloppes (à droite).

4. Conservation à basse température

Comme nous avons annoncé dans le rapport précédent, des travaux visant à étendre la durée de conservation à une année avec l'assurance d'une parfaite stabilité génotypique ont été menés sur une dizaine de génotypes de fraisier. Un essai a été conduit avec deux formes de matériel (microboutures et microbilles).

Tableau 2. Liste des génotypes de fraisier conservés pendant une année à + 4°C.

Génotypes	Microbilles	Microboutures	Durée
BE - 7		+	12 mois
BE - 21	+	+	12 mois
BE - 242	+	+	12 mois
BE - 257		+	12 mois
BE - 429	+	+	12 mois
BE - 435	+		12 mois
BE - 439	+	+	12 mois
BE - 459		+	12 mois
BE - 686		+	12 mois
BE - 688		+	12 mois

Les génotypes de fraisier maintenus sous forme de microboutures ont pu être conservés à + 4°C pendant 12 mois (tabl. 2), de même que les microbilles enrobées dans une matrice d'alginate. L'une comme l'autre reprennent sans aucune difficulté leur croissance à leur retour dans des conditions normales de culture.

5. Caractérisation

En raison d'un polymorphisme restreint au sein des marqueurs microsatellites à large spectre d'action chez les rosacées, il a fallu, cette année, concentrer nos efforts sur des marqueurs spécifiques à chaque genre. A ce jour, 6 marqueurs spécifiques au genre *Rubus* ont contribué à une ébauche de caractérisation permettant d'identifier pour la première fois 27 accessions sur 38 au moyen de leur empreinte génétique unique. D'autres marqueurs en cours d'examen pourront montrer plus de polymorphisme et ainsi clarifier la situation des 11 accessions restantes.

L'analyse des profils ADN de 4 accessions de Lloyd George provenant de différentes sources a permis de confirmer les résultats d'essais en terre, à Conthey, en mettant en évidence la présence de deux variétés enregistrées sous une même dénomination.

Des essais préliminaires utilisant des microsatellites chloroplastiques (ADN hautement conservé) nous laissent entrevoir des possibilités d'application sur des espèces au bagage génétique moins étudié. En outre, les chloroplastes peuvent fournir des informations importantes sur le géniteur femelle et ainsi améliorer la caractérisation.

Changins, le vendredi 5 février 2010

Dr. Lê-công-Linh
Groupe Biotechnologie Végétale