

Mentha × piperita '541': certification ADN de la menthe poivrée en Suisse par RAPD

José F. VOUILLAMOZ, Eleonora D'ANNA, Claude-Alain CARRON et Catherine BAROFFIO, Agroscope, 1964 Conthey
Renseignements: José Vouillamoz, e-mail: jose.vouillamoz@agroscope.admin.ch, tél. +41 27 345 35 11, www.agroscope.ch



Figure 1 | Culture de menthe poivrée (*Mentha × piperita* '541') à Reppaz sur Orsières (Valais, Suisse).

Introduction

Le genre *Mentha* inclut 25 espèces de menthe natives des régions tempérées des cinq continents, qui se distinguent par leur morphologie, leur mode de reproduction, leur nombre de chromosomes ou encore leur composition phytochimique (Tyagi *et al.* 1992). L'hybridation interspécifique est courante dans la section *Mentha* du

genre éponyme, aussi bien en culture que dans les populations naturelles, produisant ainsi des populations intermédiaires semi-fertiles ou stériles qui sont multipliées par propagation végétative (Harley et Brighton, 1977). L'hybride le plus largement cultivé pour la production de menthe poivrée est *Mentha × piperita*, issu d'un croisement *M. aquatica × M. spicata* (Harley et Brighton, 1977). En Suisse, la production de menthe poi-

vrée repose essentiellement sur le clone '541' originaire de Crimée (fig.1). La baisse de productivité observée depuis quelque temps par les producteurs fait penser à une possible dégénérescence clonale. Pourtant, lors d'un récent essai au champ, le comportement agronomique et le profil phytochimique des différentes origines du génotype '541' se sont montrés très homogènes (Carron *et al.* 2013). L'homogénéité génétique reste donc à vérifier avec des marqueurs moléculaires.

La méthode d'analyse génétique par marqueurs RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) a été mise au point par Williams *et al.* (1990). Elle fournit un nombre illimité de marqueurs qui peuvent être utilisés pour de nombreuses applications, de l'identification de variétés à la génétique des populations. En particulier, cette technique a été utilisée avec succès pour déterminer les liens génétiques (Khanuja *et al.* 2000) et l'identité des cultivars (Fenwick et Ward 2001) de plusieurs espèces de menthe.

Dans cette étude, le clone '541' cultivé en Suisse a été comparé par l'analyse de 20 marqueurs RAPD au clone '541' obtenu d'Allemagne, correspondant probablement au clone original de Crimée, ainsi qu'à 33 autres variétés ou espèces de *Mentha* afin de disposer de suffisamment de diversité pour pouvoir estimer les distances génétiques basées sur le nombre de bandes communes. La distance génétique entre les deux clones permettrait ainsi de déceler une éventuelle dégénérescence clonale.

Tableau 1 | Accessions de menthes analysées et leurs sources

Espèce/cultivar	Source ¹	Espèce/cultivar	Source ¹
<i>M. arvensis</i> 'Banana'	JDS	<i>M. × gracilis</i> 'Variegata'	JDS
<i>M. arvensis</i> var. <i>haplocalyx</i>	JDS	<i>M. × piperita</i> '541' (Allemagne)	BLL
<i>M. arvensis</i> var. <i>piperascens</i>	JDS	<i>M. × piperita</i> '541' (Suisse, <i>in vitro</i>)	ACW
<i>M. budleyana</i> 'Argente'	JDS	<i>M. × piperita</i> 'Black Peppermint'	JDS
<i>M. canadiensis</i>	JDS	<i>M. × piperita</i> 'Eichenau'	JDS
<i>M. longifolia</i> var. <i>asiatica</i>	JDS	<i>M. × piperita</i> 'Multimenta'	JDS
<i>M. longifolia</i> 'Zypern'	JDS	<i>M. × piperita</i> 'Mary Micham'	JDS
<i>M. odoratissima</i>	JDS	<i>M. × piperita</i> 'Nigra'	JDS
<i>M. pulegium</i>	JDS	<i>M. × piperita</i> 'Penny Royal'	JDS
<i>M. pulegium</i> (Maroc)	JDS	<i>M. × piperita</i> 'Schokominze'	JDS
<i>M. pulegium</i> var. <i>cervinia</i>	JDS	<i>M. × piperita</i> var. <i>citrata</i>	JDS
<i>M. spicata</i> (Maroc)	JDS	<i>M. × piperita</i> var. <i>citrata</i> 'Chartreuse'	JDS
<i>M. spicata</i> 'Regarica'	JDS	<i>M. × piperita</i> var. <i>citrata</i> 'Limona'	JDS
<i>M. spicata</i> 'Spearmint'	JDS	<i>M. × piperita</i> var. <i>citrata</i> (<i>in vitro</i> , Suisse)	ACW
<i>M. spicata</i> var. <i>ispanica</i>	JDS	<i>M. × piperita</i> var. <i>citrata</i> (Valplantes, Suisse)	ACW
<i>M. suaveolens</i> 'Variegata'	JDS	<i>M. × rotundifolia</i> 'Apfelminze'	JDS
<i>M. suaveolens</i> var. <i>mauritiana</i>	JDS	<i>M. × rotundifolia</i> 'Hillary Sweet'	JDS
<i>M. tomentosa</i>	JDS		

¹ACW = collection Agroscope ACW, Conthey, Suisse; JDS = Jardin des Senteurs, Neuchâtel, Suisse; BLL = Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Freising, Allemagne.

Résumé En Suisse, la variété de menthe poivrée la plus cultivée est *Mentha × piperita* '541', un clone originaire de Crimée. Depuis quelque temps, les producteurs ont observé une baisse sensible de la production, ce qui pourrait être dû à une dégénérescence clonale. Le clone '541' cultivé en Suisse a donc été comparé par l'analyse de 20 marqueurs RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) au clone original '541' ainsi qu'à 33 autres variétés de menthe. La distance génétique entre les deux clones était de 0 %, ce qui montre leur parfaite identité génétique. L'explication des différences observées réside donc probablement dans des causes culturelles ou épigénétiques. Par ailleurs, une distance génétique de 7 % a été observée entre la menthe orangée (*Mentha × piperita* var. *citrata*) cultivée en Suisse et maintenue *in vitro*, ce qui pourrait signifier qu'il s'agit de deux clones différents.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Au total, 35 accessions représentant une dizaine d'espèces ou d'hybrides ont été obtenues de diverses provenances (tabl.1). Les plantes ont été maintenues sous serre et de jeunes feuilles ont été prélevées pour l'extraction d'ADN.

Extraction de l'ADN et amplification des RAPD par PCR

Environ 20 mg (poids sec) de chaque échantillon ont été utilisés pour l'extraction d'ADN en suivant le protocole de QIAGEN DNEasy Plant Mini Kit. L'ADN génomique a été visualisé sur gel d'agarose 1,5 % (tampon 1X TAE) avec bromure d'éthidium (0,001 %). L'analyse RAPD a été effectuée avec 20 amorces décimères OPW1-20 (Operon Technologies, Alameda, CA, USA). L'amplification PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a été réalisée dans un volume de 20 µl contenant 30 ng d'ADN génomique, 3 mM de MgCl₂, 1X tampon PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), 0,2 µl de chaque dNTP, 0,2 U de HotStarTaq Polymerase (Qiagen) et 0,5 µM de chaque primer. L'amplification a été réalisée avec un thermocycleur dans les conditions suivantes: dénatura-tion à 94 °C pendant 3 min, suivie de 45 cycles de dénatura-tion à 94 °C pendant 15 sec, appariement des amorces à 35 °C pendant 30 sec et extension à 72 °C pendant 1,30 min, suivis d'une extension finale à 72 °C pendant 3 min. Les produits PCR ont été visualisés sur gel d'aga-rose 1 % (tampon 1X TAE) avec bromure d'éthidium (0,001 %). Afin d'assurer la reproductibilité des don-nées, chaque amplification a été effectuée deux fois.

Analyse des données

Une lettre alphabétique (A, B, C...) a été assignée à chaque bande pour chaque amorce RAPD (OPW1-20) et traitée en code binaire (1 = présent, 0 = absent). La matrice binaire a été utilisée pour calculer la distance génétique (D) en utilisant le coefficient de similarité de Nei et Li (1979): $D = 1 - SC = 1 - [2Nab / (Na + Nb)]$, où SC est le coefficient de similarité, Na est le nombre de bandes chez l'individu A, Nb est le nombre de bandes chez l'in-dividu B et Nab le nombre de bandes présentes conjointement chez les deux individus A et B. La distance a été calculée avec le logiciel R. La matrice de distance a été utilisée pour générer un dendrogramme par analyse

de nuages avec la méthode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*) en utilisant le programme MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011).

Résultats et discussion

Des 20 amorces décimères analysées, seules cinq ont permis une amplification reproductible avec toutes les 35 accessions (tabl. 2). Le nombre total de bandes clai-rement identifiables était de 37, variant de 7 (OPW18) à 12 (OPW19) par amorce. Le pourcentage de polymor-phisme observé entre toutes les accessions était très haut (98 %), soit un peu plus élevé que chez Khanuja *et al.* (2000) (93,5 %) et surtout que Fenwick et Ward (2001) (78 %). La distance génétique des 35 accessions variait de 0 à 91,7 %, des valeurs tout à fait comparables à celles obtenues par Gobert *et al.* (2002) avec l'analyse des marqueurs moléculaires AFLP sur 63 accessions de menthe (11 à 98 %). La distance génétique la plus élevée (92 %) a été observée entre *M. × rotundifolia* 'Hillary Sweet' et *M. pulegium* 'Marocaine'. Cet éloi-gnement vient probablement de la forte hétérozygo-sité de *M. × rotundifolia* 'Hillary Sweet', un hybride *Mentha suaveolens* × *Mentha × piperita* dont les pa-rents sont génétiquement les plus distants parmi les espèces de menthe (Gobert *et al.* 2002).

A l'inverse, la distance génétique entre le clone '541' de *Mentha × piperita* cultivé en Suisse et le clone '541' original de Crimée (obtenu du Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflan-zenzüchtung à Freising, Allemagne) est de 0 % (fig. 2), ce qui signifie que la baisse de rendement observée dans les cultures suisses n'est vraisemblablement pas le résul-tat d'une dégénérescence clonale, mais certainement d'origine agronomique (manque de rotation de cultures, pathogènes, facteurs environnementaux, etc.) ou épi-génétique (expression différente des gènes selon l'envi-ronnement et les stress abiotiques). Chez la menthe

Tableau 2 | Séquences des amorces montrant un polymorphisme et nombre de bandes obtenues

Amorce	Séquence	Nombre de bandes clairement visibles	Nombre de bandes polymorphes
OPW15	5'-ACA-CCG-GAAC-3'	9	8
OPW16	5'-CAG-ACC-GAGT-3'	9	9
OPW18	5'-TTC-AGG-GCAC-3'	7	7
OPW19	5'-CAA-AGC-GCTC-3'	12	12

Tableau 3 | Amplitude des distances génétiques (D) intraspécifiques

Espèce	D (%)
<i>M. arvensis</i>	45–61
<i>M. spicata</i>	33–58
<i>M. pulegium</i>	42–75
<i>M. suaveolens</i>	29
<i>M. × rotundifolia</i>	41
<i>M. longifolia</i>	45
<i>M. × piperita</i>	0–40

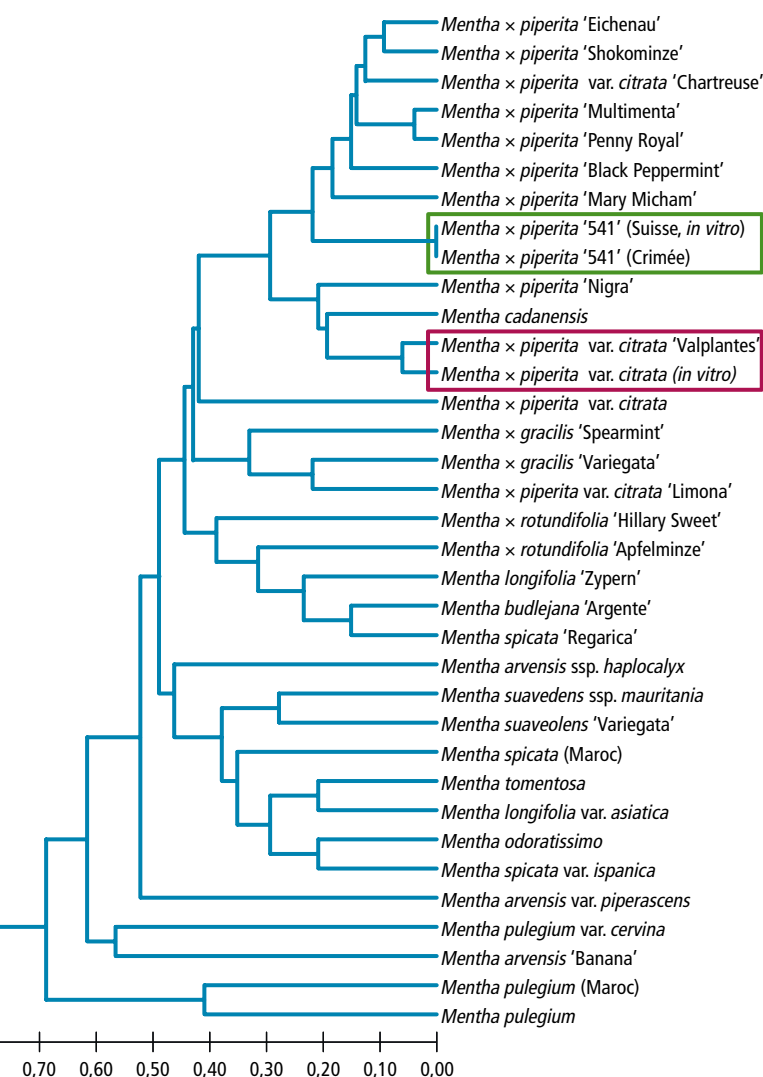


Figure 2 | Dendrogramme (UPGMA) des distances génétiques de 35 accessions de menthe basées sur la variabilité de cinq marqueurs RAPD. La distance génétique entre le clone '541' de *Mentha × piperita* (menthe poivrée) cultivé en Suisse et le clone '541' original de Crimée est de 0 % (cadre vert). La distance génétique entre l'accession cultivée et l'accession *in vitro* de *Mentha × piperita* var. *citrata* (menthe orangée) est de 7 % (cadre rouge).

Remerciements

Les auteurs remercient le Dr Heidi Heuberger, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung à Freising (Allemagne), pour la mise à disposition du clone '541' original de Crimée conservé dans leur collection.

orangée (*Mentha × piperita* var. *citrata*), une distance de 7 % a été observée entre l'accession cultivée par la coopérative Valplantes et celle maintenue *in vitro* à partir de culture. Comme il existe une grande diversité à l'intérieur de la variété *citrata*, il est probable que ces accessions recouvrent en réalité deux clones distincts. En effet, une différence significative de rendement a été observée dans des essais agronomiques (Carron *et al.* 2011). En outre, une distance génétique de 28 % a été observée entre *Mentha × piperita* var. *citrata* cultivée par la coopérative Valplantes et celle du Jardin des Senteurs, et de 40 % avec *Mentha × piperita* var. *citrata* 'Limona'. Cette forte variabilité intraspécifique est la conséquence du fort taux d'hybridation chez la menthe (Gobert *et al.* 2002), comme le confirment nos analyses (tabl. 3): la variabilité intraspécifique observée est de 0 à 40 % dans nos accessions de *Mentha × piperita*, de 48 à 61 % entre les trois accessions de *Mentha arvensis*, et de 33 à 58 % entre les quatre accessions de *Mentha spicata*.

Conclusions

- La technique RAPD a permis de montrer l'identité du clone '541' de *Mentha × piperita* cultivé en Suisse et du clone '541' témoin obtenu d'Allemagne, censé correspondre à l'original de Crimée, car leur distance génétique est de 0 %.
- Afin d'assurer le maintien de la vigueur et la qualité sanitaire de ce génotype, une régénération régulière des lignées de pieds-mères est fortement recommandée.
- Les pieds-mères régénérés *in vitro* en 2009 conservés par Agroscope sont à la disposition de la pratique pour des boutures de 1^{re} génération.
- La distance génétique de 7 % observée entre l'accession cultivée et l'accession *in vitro* de menthe orangée (*Mentha × piperita* var. *citrata*) suggère qu'il s'agit de deux clones différents. ■

Bibliographie

- Carron C. A., Vouillamoz J. F. & Baroffio C. A., 2011. Plantes médicinales et aromatiques – Rapport d'activité 2010. Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 57 p.
- Carron C. A., Vouillamoz J. F. & Baroffio C. A., 2013. Plantes médicinales et aromatiques – Rapport d'activité 2012. Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 28 p.
- Fenwick A. L. & Ward S. M., 2001. Use of random amplified polymorphic DNA markers for cultivar identification in mint. *HortSci.* **36**, 761–764.
- Gobert V., Moja S., Colson M. & Taberlet P., 2002. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *Amer. J. Bot.* **89**, 2017–2023. ➤

Summary

***Mentha × piperita* '541': DNA certification of peppermint in Switzerland by RAPD**

In Switzerland, the most cultivated variety of peppermint is *Mentha × piperita* '541', a clone native from Crimea. For some time, producers have observed a significant drop in production, which could be the result of clonal degeneration. The clone '541' grown in Switzerland has been compared to the original Crimean '541' as well as to 33 other mint varieties by the analysis of 20 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) markers. The genetic distance between both clones '541' was 0 %, showing their perfect genetic identity. The explanation of the differences therefore most likely lies in cultural or epigenetic causes. In addition, in the case of orange mint (*Mentha × piperita* var. *citrata*), a genetic distance of 7 % was observed between the accession cultivated in Switzerland and the one maintained *in vitro*, which could mean the existence of two distinct clones.

Key words: mint, genetic distance, clones, DNA markers, *Lamiaceae*.

Zusammenfassung

***Mentha × piperita* '541': DNA-Zertifizierung der Pfefferminze in der Schweiz durch RAPD**

Die in der Schweiz am meisten angebaute Pfefferminze ist *Mentha × piperita* '541', ein Klon der aus der Krim stammt. Seit einiger Zeit haben die Produzenten einen deutlichen Ertragsrückgang festgestellt, welcher könnte auf eine klonale Degeneration zurückzuführen sein. Deshalb ist der in der Schweiz angebaute Klon '541' mittels Analyse RAPD-Marker (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) mit dem Original-Klon und mit 33 anderen Minze Sorten verglichen worden. Die genetische Distanz der beiden Klone betrug 0 %, was zeigt, dass ihre genetische Identität völlig übereinstimmt. Demnach können die Ursachen für die festgestellten Unterschiede wahrscheinlich nur im Anbau oder in der Epigenetik gefunden werden. Ausserdem ist eine genetische Distanz von 7 % bei der in der Schweiz angebauten Orangenminze (*Mentha × piperita* var. *citrata*) und der *in vitro* erhaltenen Variante beobachtet werden, was auf die Präsenz zweier verschiedener Klone in der Schweiz hinweisen könnte.

Riassunto

***Mentha × piperita* '541': certificazione tramite DNA della menta piperita in Svizzera con RAPD**

In Svizzera, la varietà di menta piperita più coltivata è *Mentha × piperita* '541', un clone nativo di Crimea. Da qualche tempo, i produttori hanno osservato un significativo calo della produzione, che potrebbe essere dovuto ad una degenerazione clonale. Il clone '541' coltivato in Svizzera è stato confrontato tramite l'analisi di 20 marcatori RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) con il clone originale '541' di Crimea e con 33 altre varietà di menta. La distanza genetica tra i due cloni era di 0 %, mostrando la loro perfetta identità genetica. La spiegazione per le differenze osservate si trova quindi probabilmente nei fattori culturali o epigenetici. Inoltre, una distanza genetica del 7 % è stata osservata nella menta bergamotto (*Mentha × piperita* var. *citrata*) tra quella coltivata in Svizzera e quella mantenuta *in vitro*, che potrebbe significare la presenza di due cloni differenti.

- Harley R. M. & Brighton C. A., 1977. Chromosome numbers in the genus *Mentha* L. *Bot. J. Linn. Soc.* **74**, 71–96.
- Khanuja S. P. S., Shasany A. K., Srivastava A. & Kumar S., 2000. Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. *Euphytica* **111**, 121–125.
- Nei M. & Li W.-H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* **76**, 5269–5273.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
- Tyagi B. R., Ahmad T. & Bahl J. R., 1992. Cytology, genetics and breeding of commercially important *Mentha* species. *Curr. Res. med. arom. Plants* **14**, 51–56.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Levak K. J., Rafalski J. A. & Tingey S. V., 1990. DNA polymorphism amplification by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6531–6535.