

Identification moléculaire de la vigne

Eric DROZ, Stéphane DORSAZ, Corinne JULMI-MOREILLON et Katia GINDRO, Agroscope, 1260 Nyon

Renseignements: Eric Droz, e-mail: eric.droz@agroscope.admin.ch, tél. +41 22 363 44 19, www.agroscope.ch



Collection de vignes *in vitro*.

Introduction

De par le monde, il existe de nombreuses collections de plantes *in vitro* ou *in vivo*, conservant des dizaines, des centaines voire des milliers d'accessions d'une même espèce ou d'espèces proches. Cependant, les erreurs d'étiquetage, de manipulation ou d'enregistrement sont relativement fréquentes dans les collections et les plantes fournies comme matériel de départ ne correspondent pas toujours à la dénomination qui les accompagne. Ces erreurs entraînent souvent l'apparition d'appellations erronées ou la présence de duplicats (ou doublons). Ce phénomène a été documenté dans de nombreuses collections, par exemple pour les pommes (Gross *et al.* 2012), les cerises (Frei *et al.* 2010) ou le cacao (Zhang *et al.* 2009). Afin de dépister ces erreurs, ces

divers auteurs ont fait appel à la technique, aujourd'hui très répandue, de caractérisation par établissement de profils génétiques au moyen de marqueurs de type microsatellite, en confirmant parfois leurs résultats par une comparaison d'ordre morphologique.

Les plants de base des cépages homologués en Suisse sont préservés en serre à l'abri des insectes vecteurs de maladies. A titre de précaution, le laboratoire *in vitro* d'Agroscope à Changins conserve, lui aussi, une partie de ces cépages. Afin de vérifier l'identité des accessions et d'éviter des erreurs, les profils génétiques de ces accessions ont été établis et comparés à ceux d'une base de données suisse (Swiss Vitis Microsatellite Database; Vouillamoz *et al.* 2006) et d'une base de données européenne (European Vitis Database; Bacilieri & This 2010).

Cette technique a aussi été utilisée pour vérifier l'identité des cépages issus de la sélection à Agroscope, en comparant leurs profils à ceux de leurs géniteurs.

Matériel et méthodes

Les ADN ont été isolés à partir de feuilles (80–100 mg) au moyen du DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) finalisé par deux éluions de 100 µl. Après une dilution de 4x, 2,5 µl d'échantillon ont été utilisés pour chaque amplification sans dosage préalable de l'ADN.

Les amplifications ont été effectuées dans des thermocycleurs Doppio (VWR International bvba). Le mélange réactionnel de 25 µl contient 2,4 mM MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,2 µM de chaque amorce, 1x tampon de réaction fourni avec l'enzyme et 0,25 U Eurobiotaq (Eurobio). Une amorce par microsatellite est marquée en 5' avec le colorant DY682 ou DY782 (Eurofins MWG Synthesis GmbH). Les microsatellites utilisés sont listés dans le tableau 1.

Le programme d'amplification comprend les étapes suivantes: pré-dénaturation (94 °C, 2 min) puis 25 cycles de dénaturation (94 °C, 30 sec), hybridation (62 °C, 1 min) et élongation (72 °C, 1 min). Ces conditions ont été modifiées pour quelques microsatellites: l'hybridation a été effectuée à 64 °C pour VVMD30, à 60 °C pour VRG10mod et à 60 °C, 30 cycles pour VVlv70. Une période d'élongation supplémentaire (72 °C, 30 min) a été ajoutée à la fin du programme pour VrZag79, VVMD28, VMC2a5 et VMC8g6.

Tableau 1 | Microsatellites utilisés

Microsatellites	Référence
VVS1, VVS2, VVS4	Thomas & Scott 1993
VVMD5, VVMD6, VVMD7, VVMD21, VVMD24, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD30, VVMD31, VVMD32	Bowers <i>et al.</i> 1999
VVlb01, VVlb66, VVlh54, VVln16, VVln73, VVlp31, VVlp60, VVlq52, VVlv37, VVlv67, VVlv70	Merdinoglu <i>et al.</i> 2005
VMC1b11, VMC1f10, VMC2a5, VMC2h4, VMC3c9, VMC4f3, VMC5g7, VMC6c10, VMC8g8	Vitis Microsatellite Consortium (Collaboration Agreement for the Development of Grape Microsatellite Markers 1998)
VrZAG25, VrZAG62, VrZAG79	Sefc <i>et al.</i> 1999
VRG04	Regner <i>et al.</i> 2006
VRG01mod, VRG10mod	Modifiés à partir de Regner <i>et al.</i> 2006

Résumé ■ Authentifier les accessions d'une collection *in vitro* destinée à la conservation sur le long terme est devenu une priorité pour de nombreux laboratoires. A Agroscope, les profils génotypiques des accessions de vigne ont été établis au moyen de trente-huit microsatellites. L'analyse des résultats et la comparaison avec ceux de deux bases de données suisse et européenne ont permis de confirmer l'identité des cépages de la collection. Quarante et une accessions représentant vingt cépages ont été authentifiées. Le processus de génotypage a aussi permis de vérifier les résultats des croisements du programme de sélection de la vigne à Agroscope par analyse de parenté. Les profils de huit cépages récents ont été comparés notamment à ceux de leurs géniteurs et ont ainsi confirmé leur identité.

Les fragments amplifiés sont ensuite séparés sur un gel d'acrylamide (6,5 % acrylamide:bisacrylamide 19:1, 7M urée, TBE 1x) de 0,25 mm d'épaisseur sur un séquenceur Li-Cor 4300 (LI-COR Biosciences UK Ltd) et analysés par le programme SAGA (LI-COR Biosciences UK Ltd).

Les identités ont été vérifiées en comparant les profils génétiques des microsatellites avec ceux provenant des bases de données et publications suivantes: svmd (Swiss Vitis Microsatellite Database; Vouillamoz *et al.* 2006), eu-vitis (European Vitis Database; Bacilieri & This 2010) et Vassal (Laucou *et al.* 2011; Lacombe *et al.* 2013).

Les tests de parenté ont été effectués avec le programme Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007) utilisant 38 microsatellites.

Résultats

Les profils établis pour neuf microsatellites ont été comparés à ceux de la base de données européenne, ce qui a permis de confirmer l'identité de trente-cinq clones répartis en dix-neuf cépages (tabl. 2). Parmi les accessions non présentes dans cette base de données, les profils de sept d'entre elles, représentant six cépages, ont trouvé leur pendant dans la base de données suisse, validant ainsi leur identité (tabl. 2).

Aucun profil ne correspond à celui du cépage Mara dans les deux bases de données précitées. Toutefois, en effectuant un test de parenté au moyen des résultats obtenus pour trente-huit microsatellites, seuls deux géniteurs se sont avérés possibles parmi les accessions de notre base de données: le Gamay et le Reichensteiner. Le Gamaret et le Garanoir sont, comme le Mara,

issus d'un croisement entre ces deux cépages, mais les profils des trois descendants sont différents. Ces tests corroborent que l'accession Mara est bien issue du croisement entre Gamay et Reichensteiner, tout en étant différente des deux autres cépages issus de la même sélection. L'accession conservée *in vitro* est ainsi vraisemblablement du Mara. Le profil du Carminoir, récemment entré au conservatoire, n'a pas encore été établi: la vérification interviendra de ce fait ultérieurement.

Tableau 2 | Vérification de la conformité génétique des cépages *in vitro* d'après deux bases de données ou par analyse de parenté

Cépage	Clone	eu-vitis	svmd	Parenté
Amigne	RAC 32	✓		
Arvine	RAC 22	✓		
Cabernet Sauvignon	337	✓		✓
Carminoir	RAC 30			
Chardonnay	RAC 17, 26	✓		✓
Charmont	RAC 27		✓	✓
Chasselas	RAC 04, 05, 06, 07, 08 & 800	✓		
Diolinoir	RAC 16		✓	✓
Divico	RAC 40			✓
Doral	RAC 13		✓	✓
Ermitage/Marsanne	RAC 35 & 36	✓		
Gamaret	RAC 14	✓		✓
Gamay	RAC 09, 10 & 23	✓		✓
Garanoir	RAC 15		✓	✓
Gewürztraminer	RAC 25 & Cl. 47	✓		
Humagne blanc	RAC 33 & 0-71-74		✓	
Humagne rouge	RAC 38	✓		
Mara	RAC 31			✓
Merlot	RAC 19, 20 & 21	✓		
Païen/Savagnin blanc	RAC 34	✓	✓	
Pinot blanc	RAC 28	✓		
Pinot gris	RAC 18	✓		
Pinot noir	RAC 11, 12, FAW 1, 2-45, 9-18 & Mariafeld	✓		
Rouge de Diolly		✓		
Sylvaner	RAC 39	✓		
Syrah	447	✓		
Vitis 3309	RAC 01 porte-greffe	✓		

eu-vitis: European Vitis Database (Bacilieri & This 2010). svmd: Swiss Vitis Microsatellite Database (Vouillamoz *et al.* 2006).

✓ Le profil du cépage correspond à celui de la base de données ou le test de parenté a montré que ses géniteurs possibles correspondaient à ceux annoncés.

Ainsi, l'identité de quarante et une accessions du conservatoire représentant vingt cépages a été confirmée par comparaison avec des bases de données indépendantes.

Les tests de parenté ont nécessité de déterminer les profils d'une trentaine de cépages (notamment des cépages communs en Suisse ou des parents potentiels). Afin de vérifier le système, les profils de trois cépages témoins (Cabernet Sauvignon, Chardonnay et Gamay) ont été introduits dans la base de données et soumis au processus de détection de parenté du programme Cervus 3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007). Les résultats ont clairement démontré que les seules paires de parents potentiels correspondaient aux géniteurs annoncés (tabl. 3). L'opération a été répétée pour les cépages issus de la sélection d'Agroscope (Charmont, Diolinoir, Divico, Doral, Galotta, Gamaret, Garanoir et Mara) et tous les croisements ont été confirmés (tabl. 4).

Tableau 3 | Confirmation de la parenté de cépages témoins, avec 38 microsatellites

Cépage	Parent 1	Parent 2	Parenté
Cabernet Sauvignon	Cabernet franc	Sauvignon blanc	vérifiée
Chardonnay	Pinot	Gouais blanc	vérifiée
Gamay	Pinot	Gouais blanc	vérifiée

Tableau 4 | Confirmation de la parenté de cépages de la sélection d'Agroscope, avec 38 microsatellites

Cépage	Parent 1	Parent 2	Parenté
Charmont	Chasselas	Chardonnay	vérifiée
Diolinoir	Rouge de Diolly (Robin noir)	Pinot	vérifiée
Divico	Gamaret	Bronner*	vérifiée
Doral	Chasselas	Chardonnay	vérifiée
Galotta	Ancelotta	Gamay	vérifiée
Gamaret	Gamay	Reichensteiner	vérifiée
Garanoir	Gamay	Reichensteiner	vérifiée
Mara	Gamay	Reichensteiner	vérifiée

*Cépage interspécifique obtenu par la Station de Freiburg (D) à ne pas confondre avec le semis de Pinot noir obtenu par M. Bronner (D).

Discussion

Sauf exceptions, le profilage génotypique par microsatellites ne permet pas de différencier des clones d'un même cépage. Les clones ont souvent acquis leurs caractéristiques propres par des mutations ponctuelles. Le profilage se fait par sondages dans des régions hypervariables de l'ADN et la probabilité que ces sondages mettent en évidence une mutation ponctuelle est très faible. La vérification d'identité s'est donc arrêtée au niveau du cépage sans aller jusqu'au clone.

Les programmes Cervus et FaMoz sont généralement utilisés pour effectuer des recherches de parenté lorsque les géniteurs sont inconnus (Lacombe *et al.* 2013), par exemple pour définir l'origine d'un ancien cépage. Il importe alors que la base de données contienne le maximum possible de profils. Ces auteurs ont utilisé 20 microsatellites pour l'établissement des profils. En revanche, dans le travail présenté ici, il s'agit seulement de vérifier que les croisements annoncés sont possibles, qu'il n'y a pas eu d'autofécondation et que les accessions n'ont pas été mélangées ou mal étiquetées. Il n'est donc pas nécessaire de disposer d'un très grand nombre de profils différents: les géniteurs et quelques témoins suffisent; dans le cas précis, la validation des résultats s'appuie sur un nombre élevé

de microsatellites (38). L'utilisation de microsatellites ciblant l'ADN chloroplastique permettrait de définir les parents mâles et les parents femelles. Cette technique n'ayant pas été appliquée à toutes les accessions, l'ordre dans lequel les parents sont cités ne reflète pas le sexe de ceux-ci.

Conclusions

- Un kit de 38 microsatellites a été adapté aux conditions du laboratoire et les résultats obtenus sont compatibles avec ceux d'autres chercheurs.
- Ce kit de microsatellites a permis d'authentifier les accessions du conservatoire *in vitro* d'Agroscope en comparant les profils obtenus pour 41 accessions représentant 20 cépages avec ceux de deux bases de données indépendantes.
- Les tests de parenté ont confirmé que les géniteurs des cépages issus de la sélection d'Agroscope correspondent aux parents annoncés et qu'il n'y a pas eu d'erreur de manipulation ou d'étiquetage au cours du long processus de sélection.
- Le laboratoire d'Agroscope est maintenant qualifié pour analyser des échantillons de diverses provenances, les authentifier ou chercher leurs équivalents dans diverses bases de données. ■

Bibliographie

- Bacilieri R. & This P., 2010. GrapeGen06, an European project for the management and conservation of grapevine genetic resources. Adresse: <http://www1.montpellier.inra.fr/grapegen06/> [24 septembre 2013]
- Bowers J. E., Dangl G. S. & Meredith C. P., 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 243–246.
- European Vitis Database, © JKI 2007–2011. Adresse: <http://www.eu-vitis.de> [24 septembre 2013]
- Frei A., Szalatnay D., Zollinger T. & Frey J. E., 2010. Molecular characterisation of the national collection of Swiss cherry cultivars. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **85**, 277–282.
- Gross B. L., Volk G. M., Richards C. M., Forsline P. L., Fazio G. & Chao C. T., 2012. Identification of "duplicate" accessions within the USDA-ARS national plant germplasm system *Malus* collection. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **137** (5), 333–342.
- Kalinowski S. T., Taper M. L. & Marshall T. C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**, 1099–1106.
- Lacombe T., Boursiquot J.-M., Laucou V., Di Vecchi-Staraz M., Péros J.-P. & This P., 2013. Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Theoretical & applied Genetics* **126**, 401–414.
- Laucou V., Lacombe T., Dechesne F., Siret R., Bruno J.-P., Dessup M., Dessup T., Ortigosa P., Parra P., Roux C., Santoni S., Varès D., Péros J.-P., Boursiquot J.-M. & This P., 2011. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theoretical & applied Genetics* **122**, 1233–1245.
- Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet A., Adam-Blondon A.-F. & Decroocq S., 2005. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Molecular Breeding* **15**, 349–366.
- Regner F., Hack R. & Santiago J. L., 2006. Highly variable *Vitis* microsatellite loci for the identification of Pinot noir clones. *Vitis* **45** (2), 85–91.
- Sefc K. M., Regner F., Turetschek E., Gloessl J. & Steinkellner H., 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* **42**, 367–373.
- Thomas M. R. & Scott N. S., 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical & applied Genetics* **86**, 895–990.
- Vouillamoz J. F., Frei A. & Arnold C., 2006. Swiss Vitis Microsatellite Database. Adresse: <http://www1.unine.ch/svmd/index.php?details=117> [24 septembre 2013]
- Zhang D., Mischke S., Johnson E. S., Phillips-Mora W. & Meinhardt L., 2009. Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes* **5**, 1–10.

Summary**Molecular identification of grapevine**

Authenticating accessions from an *in vitro* collection established for long term conservation has become a priority for numerous research laboratories. At Agroscope, the genotypic profiles of the grapevine accessions have been established using 38 microsatellites. The analysis of the results and comparison with those of a Swiss database and of an European database allowed to confirm the identity of the grape cultivars in the collection. 41 accessions representing 20 cultivars have thus been authenticated. The genotypic process also allowed to verify the results of crosses issued from the grapevine breeding programme of Agroscope by parentage analysis. Profiles from 8 recent cultivars were compared with those of their progenitors among others and thus confirmed their identity.

Key words: microsatellite, SSR, molecular identification, parentage, grapevine.

Zusammenfassung**Molekulare Identifizierung von Weinreben**

Die Authentifizierung von *in vitro* Akzessionen für die Langzeitkonservierung stellt für zahlreiche Forschungslabore eine Priorität dar. In Agroscope Laboren wurden mittels 38 Mikrosatelliten genotypische Profile von Reben Akzessionen erstellt. Die Analyse der Ergebnisse und der Vergleich mit denjenigen aus einer Schweizer und einer Europäischen Datenbank ermöglichten es die Identität der Rebsorten in der Sammlung zu bestätigen. 41 Akzessionen, die 20 Rebsorten verstellten wurden so authentifiziert. Der Genotypisierungsprozess, bei dem mit Verwandtschaftsanalyse gearbeitet wurde, hat es ebenfalls ermöglicht die Ergebnisse aus Kreuzungen zu bestätigen, die aus dem Agroscope Zuchtprogramm für Rebsorten stammen. Profile von 8 neuen Rebsorten wurden unter anderem mit denen ihrer Stammeltern verglichen, wodurch ihre Identität bestätigt werden konnte.

Riassunto**Identificazione molecolare della vite**

Per numerosi laboratori autenticare le accessioni di una collezione *in vitro* destinata alla conservazione su lungo termine è diventato una priorità. Nel laboratorio di Agroscope, i profili genotipici delle accessioni di vite sono stati stabiliti mediante 38 microsatelliti. L'analisi dei risultati e il confronto con quelli presenti nelle due banche dati svizzere ed europee hanno permesso di confermare l'identità dei vitigni della collezione. 41 accessioni rappresentanti 20 vitigni sono quindi state autenticate. Il processo di genotipaggio ha anche permesso di verificare, mediante analisi di parentela, i risultati degli incroci del programma di selezione della vite di Agroscope. L'identità di 8 recenti vitigni è stata confermata grazie al confronto inoltre con i loro genitori.