

Identification des cépages dans les raisins, les moûts et les vins : possibilités actuelles et perspectives offertes par les marqueurs moléculaires

Autor(en): **Maigre, Dominique**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **92 (2001)**

Heft 6

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981928>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Identification des cépages dans les raisins, les moûts et les vins: possibilités actuelles et perspectives offertes par les marqueurs moléculaires*

Dominique Maigre, Station fédérale de recherches en production végétale de Changins, Centre viticole du Caudoz, Pully

Introduction

Pour la vigne comme pour les autres espèces végétales d'intérêt agronomique, le développement de techniques permettant la caractérisation et l'identification des variétés est nécessaire. Ces outils servent d'aide à la sélection, à la gestion des ressources génétiques et des collections ampélographiques ainsi que comme instruments de contrôle au niveau de la production et de la commercialisation du matériel de multiplication. Pendant longtemps, l'ampélographie dite «classique», basée sur des descriptions morphologiques, a été l'unique instrument à disposition. Depuis quelques années, de nouvelles techniques de biologie moléculaire sont apparues dans la recherche viticole. Basées directement sur l'information génétique des variétés, ces méthodes présentent l'avantage de ne dépendre ni des facteurs environnementaux (conditions de croissance), ni de l'état physiologique et phénologique de la plante (âge, cycle saisonnier). Différentes techniques ont été développées, mais la plus prometteuse pour la vigne est sans doute celle des «microsatellites». Elle a été mise au point en Australie et aux Etats-Unis (2, 17). Actuellement, de nombreux laboratoires en Europe et dans le monde poursuivent des recherches au moyen de ces techniques.

Caractéristiques des techniques moléculaires

Les analyses à base de techniques moléculaires comme les microsatellites peuvent en principe être entreprises à n'importe quel moment de l'année, indépendamment du stade de développement végétatif de la plante à étudier. Pour l'analyse, on

* Conférence présentée le 31 août 2001 à Mendrisio lors de la 113^e assemblée annuelle de la Société suisse de chimie alimentaire et environnementale

peut aussi bien utiliser des feuilles que des sarments aoûtés. L'étude du matériel ligneux est très utile dans le cas des porte-greffe par exemple, puisqu'elle donne la possibilité d'analyser directement les bois pour s'assurer de leur identité variétale. Les baies (14), le moût et le moût en fermentation (16), peuvent également être utilisés pour l'identification d'un cépage. La détermination du cépage à partir du vin nécessite en revanche encore d'autres recherches en raison de la très faible quantité d'ADN dans le vin. La caractérisation moléculaire permet une identification quasi absolue des variétés sans être dépendante de facteurs environnementaux ou physiologiques. De plus, la nature quantitative des résultats (présence ou absence d'un allèle donné) permet de calculer des degrés de ressemblance génétique entre les cépages et facilite les échanges d'information entre les différents acteurs de ces recherches. Le type de transmission héréditaire des marqueurs microsatellites rend possible l'étude des hybrides et des métis, ainsi que la cartographie des gènes du génome de la vigne. Parmi les limites de ces méthodes, il faut signaler que le pouvoir de discrimination se limite pour l'instant au niveau de la variété, voire de la famille variétale. En effet, il est aujourd'hui impossible de distinguer les différents types d'une variété ainsi que les différents cépages d'une même famille comme les Pinot noir, gris et blanc. Il est cependant probable qu'à l'avenir, le développement de nouveaux marqueurs microsatellites permettra également d'obtenir une discrimination à ce niveau là; des travaux prometteurs sont d'ailleurs actuellement en cours (1, 13).

Qu'est-ce qu'un microsatellite?

Chez la vigne comme chez tous les organismes supérieurs, une grande partie de l'ADN n'a pas de fonction codante, c'est à dire qu'elle n'est pas responsable de l'expression phénotypique d'un caractère. Une part importante de cet ADN non codant est organisé en séquences répétées de taille variable. Parmi ces séquences, les marqueurs microsatellites sont des segments d'ADN (fig. 1) formé de répétitions de certains éléments de base de l'ADN, les nucléotides (adénine [A], thymine [T], guanine [G] et cytosine [C]). La taille des microsatellites peut varier de 2 à 4 nucléotides (exemples: $[GA]_n$, $[CA]_n$, $[AT]_n$, $[ATA]_n$, $[CTT]_n$ ou $[GATA]_n$). Ils sont spécifiques d'un locus donné, c'est à dire d'un site sur le chromosome. Les microsatellites montrent un très haut niveau de polymorphisme, c'est-à-dire qu'il peut y avoir des variations entre les cépages (fig. 2). Leur caractère discriminant en fait un outil très performant pour la caractérisation moléculaire des variétés.

Le procédé d'analyse repose sur la localisation et l'amplification (multiplication) par PCR (Polymerase Chain Reaction) d'un fragment d'ADN qui contient le microsatellite afin de rendre ce fragment «visible» et mesurable.

L'analyse des produits d'amplification permet de mettre en évidence le polymorphisme du microsatellite (fig. 3). Pour un microsatellite donné, on a au maximum deux bandes par individu diploïde (une seule pour un locus homozygote).

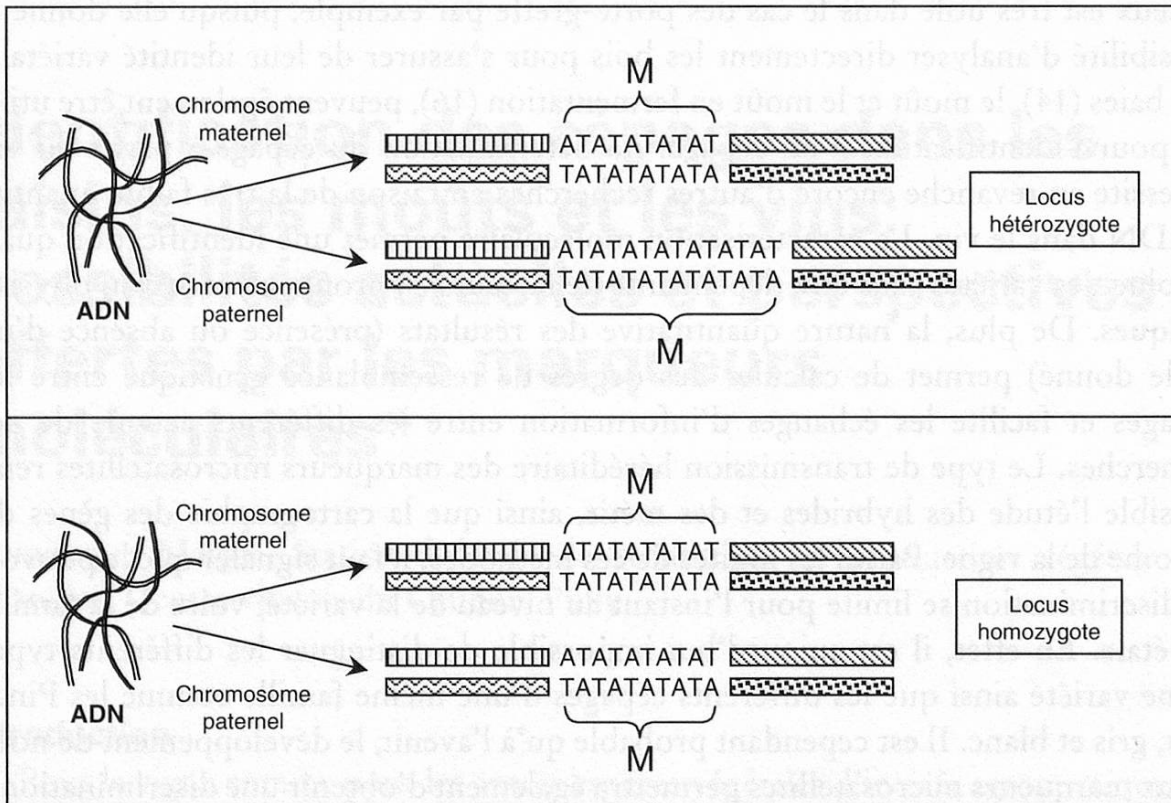


Figure 1 **Un microsatellite (M) est un segment d'ADN contenant des nucléotides répétés un certain nombre de fois (ici AT).** C'est le nombre des répétitions, très variable, qui crée le polymorphisme entre les cépages. Lorsqu'un cépage est homozygote pour un locus donné, la taille du microsatellite est identique sur les chromosomes maternel et paternel. S'il est au contraire hétérozygote, les tailles sont alors différentes

En résumé, les phases d'analyses sont les suivantes:

- extraction de l'ADN du matériel végétal
- amplification par PCR des marqueurs moléculaires
- analyse des produits d'amplification par électrophorèse ou séquenceur
- interprétation et élaboration du profil ADN.

De nombreuses études utilisant la technique des microsatellites sont conduites dans les laboratoires du monde entier.

Quelques résultats obtenus à l'étranger

Le Sylvaner n'est pas le père du Müller-Thurgau

Le cépage Müller-Thurgau, plus connu en Suisse sous le nom de Riesling x Sylvaner était considéré comme une obtention issue de la fécondation du Riesling par le pollen du Sylvaner. En se basant sur des observations morphologiques, les ampélographes avaient depuis longtemps mis en doute le fait que le Sylvaner soit le père du

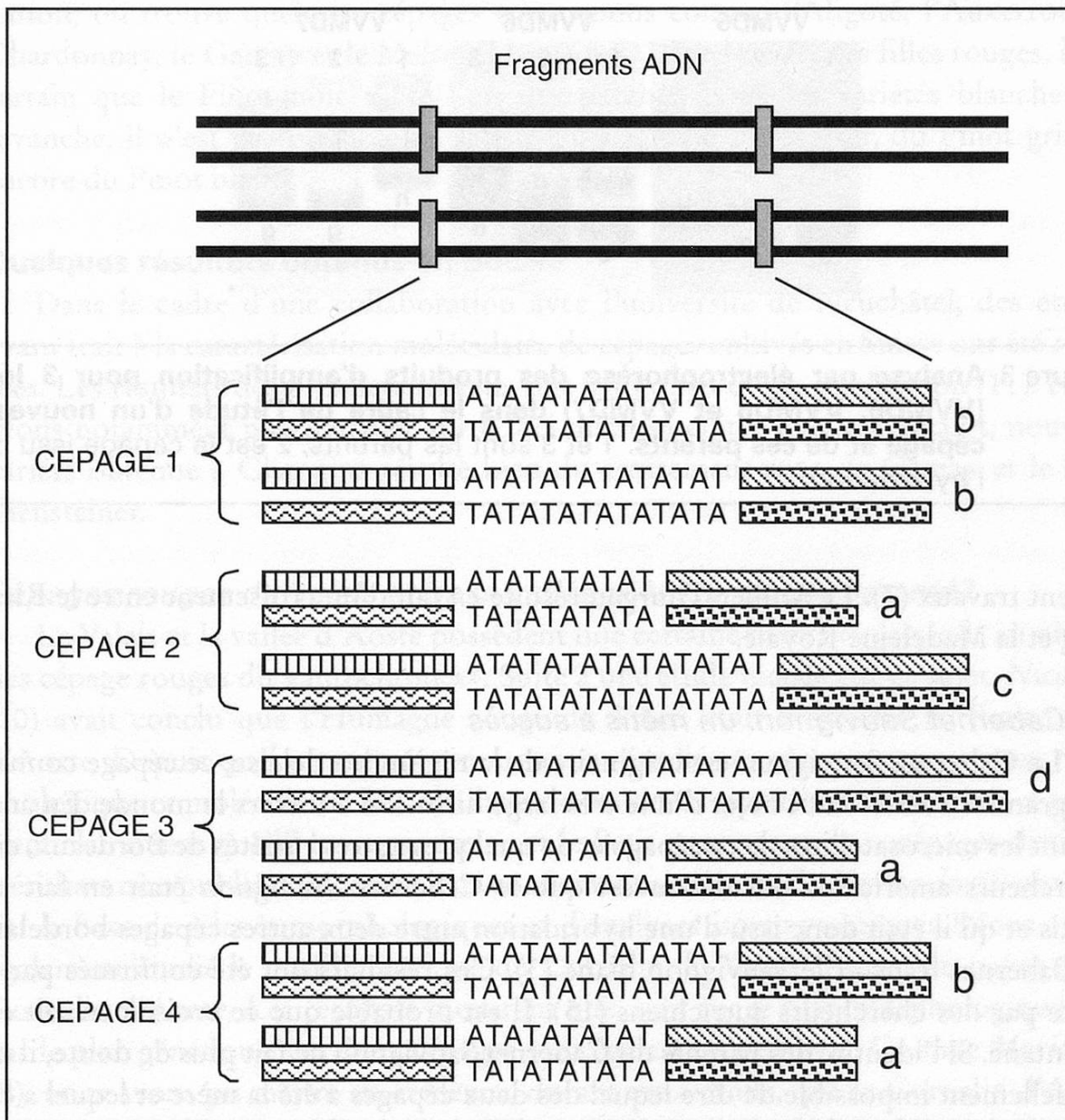


Figure 2 **Les microsatellites (ici [AT]_n) montrent un haut niveau de polymorphisme.** Dans ce cas, les fragments amplifiés montrent quatre tailles différentes (a, b, c, d). Aucun des quatre cépages n'a le même profil génétique pour ce locus (bb, ac, da, ba). Seul le cépage 1 est homozygote pour ce locus

Müller-Thurgau; ils n'avaient cependant jamais pu le prouver formellement (5, 8). Il y a quelques années, des chercheurs allemands ont démontré, par des techniques moléculaires, que si la mère du Müller Thurgau était bien le Riesling, le cépage père n'était pas le Sylvaner (6). Par la suite, ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs (11, 12, 15). L'identité du cépage père est maintenant clarifiée. Certains chercheurs avaient prétendu qu'il s'agissait du Chasselas (12), ce qui a été infirmé par de

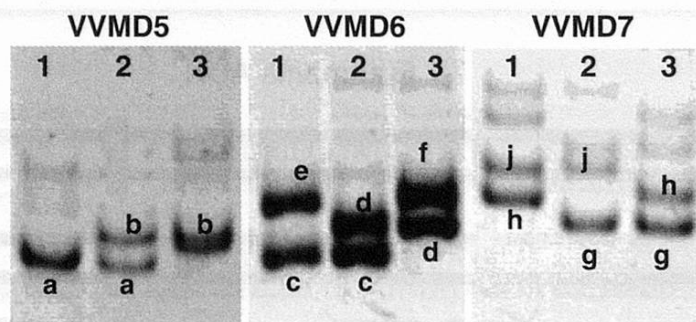


Figure 3 **Analyse par électrophorèse des produits d'amplification pour 3 loci (VVMD5, VVMD6 et VVMD7) dans le cadre de l'étude d'un nouveau cépage et de ses parents.** 1 et 3 sont les parents, 2 est le cépage issu de l'hybridation

récent travaux (7). Le Müller-Thurgau résulte en fait d'un croisement entre le Riesling et la Madeleine Royale.

Le Cabernet Sauvignon: un métis à succès

Le Cabernet Sauvignon est originaire de la région bordelaise; ce cépage connaît un grand succès et fait l'objet d'une très large diffusion à travers le monde. En analysant les microsatellites de ce cépage et de quelques autres variétés de Bordeaux, des chercheurs américains ont découvert que le Cabernet Sauvignon était en fait un métis et qu'il était donc issu d'une hybridation entre deux autres cépages bordelais, le Cabernet franc et le Sauvignon blanc (3). Ces résultats ont été confirmés par la suite par des chercheurs autrichiens (15). Il est probable que ce croisement ait été spontané. Si l'identité des parents du Cabernet Sauvignon ne fait plus de doute, il est actuellement impossible de dire lequel des deux cépages a été la mère et lequel a été le père.

Le Pinot et le Gouais blanc sont parents d'une famille nombreuse

La majorité des cépages existant aujourd'hui sont très anciens. On pense qu'ils ont vu le jour à la suite de divers mécanismes comme la domestication de vignes sauvages, d'hybridations spontanées entre vignes sauvages et variétés cultivées ou encore l'hybridation spontanée entre variétés cultivées. Des hybridations contrôlées ont été pratiquées par l'homme depuis le milieu du XIX^{ème} siècle afin de créer de nouvelles variétés. Des travaux visant à identifier les parents de quelques cépages français importants ont été conduits par une équipe de chercheurs. Un nombre important de variétés du Nord-Est de la France a été étudié au niveau des microsatellites. Il en ressort que deux cépages seulement semblent être les parents de 16 autres variétés (4). Ces deux cépages parents sont le Pinot et le Gouais blanc qui était très répandu dans l'est de la France au Moyen-Age, et que l'on cultive encore

aujourd'hui dans le Haut-Valais (Gwäss). Parmi les 16 variétés issues de cette hybridation, on trouve quelques cépages très connus comme l'Aligoté, l'Auxerrois, le Chardonnay, le Gamay et le Melon (Muscadet). Pour les variétés filles rouges, il est certain que le Pinot noir a été l'un des parents; pour les variétés blanches en revanche, il n'est pas possible de savoir s'il s'agit du Pinot noir, du Pinot gris ou encore du Pinot blanc.

Quelques résultats obtenus en Suisse

Dans le cadre d'une collaboration avec l'université de Neuchâtel, des études ayant trait à la caractérisation moléculaire de cépages cultivés en Suisse ont été réalisées. Les résultats des premiers travaux ont fait l'objet d'une publication (11). Nous avons notamment pu contrôler sur 8 loci microsatellites que le Gamaret, nouvelle variété obtenue à Changins résulte bien du croisement entre le Gamay et le Reichensteiner.

Cépages rouges du Valais et de la vallée d'Aoste, quelle parenté?

Le Valais et la vallée d'Aoste possèdent une certaine diversité variétale au niveau des cépages rouges dit «autochtones». Suite à une étude menée sur ce sujet, *Nicollier* (10) avait conclu que l'Humagne rouge du Valais était identique au Petit rouge d'Aoste. Depuis quelques années, nous avons étudié ces cépages aux niveaux morphologique et moléculaire. Les résultats de ces deux approches convergent et montrent clairement que l'Humagne rouge et le Petit rouge sont deux cépages distincts (résultats non publiés). Nos résultats confirment ainsi ceux de *Moriondo* (9) obtenus sur la base de relevés morphologiques et d'analyses isoenzymatiques. Nous avons également étudié le profil génétique du Cornalin du Valais (Rouge du pays) et du Cornalin d'Aoste. Les résultats montrent que, tant sur le plan morphologique que sur le plan génétique, ces deux cépages sont également distincts. Comme *Moriondo* (9), nous avons pu mettre en évidence, durant cette étude, que le Cornalin d'Aoste est très probablement identique à l'Humagne rouge du Valais. Nos résultats se basent sur la comparaison morphologique d'une part et sur l'analyse de 5 loci microsatellites d'autre part (résultats non publiés). L'étude d'autres microsatellites devra encore être effectuée pour confirmer ces résultats.

D'une manière plus générale, l'étude des cépages rouges indigènes du Valais et de la vallée d'Aoste montre qu'il existe un certain lien de parenté entre tous ces cépages (Humagne rouge, Cornalin, Durize, Goron, Vuillermin, Fumin, Petit Rouge, Vien de Nus, Mayolet, Oriou). On se trouve dans ce cas en présence d'un pool génétique qu'il serait assurément intéressant d'étudier de manière plus approfondie.

Le Rouge de Diolly, mère du Diolinoir, est identifié

Le Diolinoir est une nouvelle variété obtenue en 1970 à la Station de Changins. Il résulte de la fécondation du Rouge de Diolly par du pollen de Pinot noir. Le Rouge de Diolly a été introduit à Pully il y a une cinquantaine d'années en prove-

nance des collections du Dr Henry Wuilloud de Diolly sur Sion. Le nom exact de cette variété n'avait jamais pu être établi. L'École de Montpellier, par J.-M. Boursiquot, a introduit le Rouge de Diolly dans ses collections en 1989. Grâce à cette collaboration, il a été possible de montrer que le Rouge de Diolly était morphologiquement identique au Robin noir, cépage non cultivé en dehors des collections de quelques stations de recherches. Ce cépage semble provenir de la Drôme.

L'analyse des microsattellites a montré que ces deux cépages possèdent la même composition allélique sur les 14 loci étudiés. Ce résultat confirme les observations morphologiques et il est donc possible de conclure que le Rouge de Diolly et le Robin noir sont deux cépages identiques (résultats non publiés).

Conclusion

Les techniques moléculaires sont un outil puissant au service de la recherche viticole. Elles sont utilisées à des fins d'identification ainsi qu'à l'étude des liens de parenté entre les cépages. L'établissement de banques de données internationales devrait permettre à terme une reconnaissance très précise et très rapide des variétés non identifiées. Ces techniques sont actuellement essentiellement utilisées sur des échantillons de matériel végétal (sarmant, jeunes feuille, fruits) et non pas sur des produits finis comme le vin. La faible quantité d'ADN présente dans le vin rend la technique inapplicable avec les protocoles d'analyses actuellement disponibles.

Résumé

Le récent développement des techniques de biologie moléculaire a fourni de nouveaux moyens de caractériser et de reconnaître les cépages en se basant directement sur l'information génétique des variétés. Ces méthodes de caractérisation présentent l'avantage de ne dépendre ni des facteurs environnementaux ni de l'état physiologique et phénologique de la plante. Parmi les différentes techniques développées, la plus prometteuse est celle des microsattellites; cette technique se montre très polymorphe. Un microsattellite est un segment d'ADN non codant, formé par des répétitions de deux, trois ou quatre nucléotides. Cette technique est actuellement essentiellement utilisée sur des échantillons de matériel végétal (sarmant, jeunes feuille, fruits) et non pas sur des produits finis comme le vin. La faible quantité d'ADN présente dans le vin rend la méthode malheureusement inapplicable avec les protocoles d'analyses actuellement disponibles.

Zusammenfassung

Die Entwicklungen in der Molekularbiologie haben neuartige Methoden zur Charakterisierung und Bestimmung der Rebsorten möglich gemacht. Durch die direkte Abstützung auf die genetischen Informationen kann man Faktoren, welche von der Umwelt und vom physiologischen und phänologischen Zustand der Pflanze abhängen, eliminieren. Unter den verschiedenen neuentwickelten Techniken ist die der Mikrosattelliten am vielversprechendsten und zeigt einen hohen Grad

an Polymorphismus. Ein Mikrosatellit ist ein DNS-Strang, der durch die Wiederholungen von zwei, drei oder vier Nukleotiden gebildet wird. Diese Methoden werden momentan hauptsächlich an pflanzlichen Proben wie Trieben, Blättern und Früchten angewendet, jedoch nicht an Endprodukten, wie z.B. Wein. Die heute verfügbaren Analysemethoden lassen eine direkte Anwendung im Wein noch nicht zu, da dieser nur sehr geringe DNS Mengen enthält.

Summary "Identification of Grapevine Varieties in Berries, Musts and Wines: Present and Future Possibilities Using Molecular Markers"

The recent development in molecular biology has provided new methods for characterisation and detection of grapevine varieties based on genetic information. These methods present the advantage that they don't depend on environmental, physiological or phenological factors. Of the currently available protocols, using microsatellites is the most promising one showing a very high degree of polymorphism. A microsatellite is a DNA segment formed of repetitions of two, three or four nucleotides. The mentioned techniques are at the moment primarily applied on vegetal material like stem, young leaf, fruits, but not on finished products like wine. Unfortunately, the low DNA content of wine doesn't allow the direct application of the current protocols.

Key words

Grapevine, Wine, Molecular markers, Microsatellite, Genetic identification

Bibliographie

- 1 *Boursiquot, J.-M.*: Communication personnelle. Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier (2000).
- 2 *Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R. and Meredith, C.P.*: Isolation and characterization of new polymorphic single sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* **39**, 628–633 (1996).
- 3 *Bowers, J.E. and Meredith, C.P.*: The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genet.* **16**, 84–87 (1997).
- 4 *Bowers, J., Boursiquot, J.-M., This, P., Chu, K., Johansson, H. and Meredith, C.*: Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay and other wine grapes of northeastern France. *Sciences* **285**, 1562–1565 (1999).
- 5 *Breider, H.*: Die Müller-Thurgau-Frage und Fragen der Klonenentstehung. *Weinblatt* **15**, 272–273 (1952).
- 6 *Büscher, N., Zyprian, E., Bachmann, O. and Blaich, R.*: On the origine of grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis* **33**, 15–17 (1994).
- 7 *Dettweilwer, E., Jung, A., Zyprian, E. and Töpfer, R.*: Grapevine cultivar Müller-Thurgau and its true to type descent. *Vitis* **39**, 63–65 (2000).
- 8 *Eichelsbacher, H.M.*: Ein genetisch-züchterischer Vergleich der Rebsorten Riesling, Silvaner und Müller-Thurgau. *Gartenbauwiss.* **22**, 99–139 (1957).
- 9 *Moriondo, G.*: Vini e vitigni autoctoni della Valle d'Aosta. Institut Agricole Régional 139 p. (1999).

- 10 Nicollier, J.: Un dossier relatif aux cépages dits rouges du Pays en Valais et rouge indigènes en vallée d'Aoste. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 4, 132–135 (1972).
- 11 Perret, M., Godio, A. et Maigre, D.: Identification des cépages au moyen de marqueurs moléculaires. *Revue Suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 30, 253–257 (1998).
- 12 Regner, F., Steinkellner, H., Turetschek, E., Stadlhuber, A. und Glössl, J.: Genetische Charakterisierung von Rebsorten (*Vitis vinifera*) durch Mikrosatelliten-Analyse. *Mitteilungen Klosterneuburg* 46, 52–60 (1996).
- 13 Regner, F., Wiedeck, E. and Stadlbauer, A.: Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. *Vitis* 39, 103–107 (2000).
- 14 Sefc, K.M., Guggenberger, S., Regner, F., Lexer, C., Glössl, J. and Steinkellner, H.: Genetic analysis of grape berries and raisins using microsatellite markers. *Vitis* 37, 123–125 (1998).
- 15 Sefc, K.M., Steinkellner, H., Wagner, H.W., Glössl, J. and Regner, F.: Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *Vitis* 36, 179–183 (1997).
- 16 Siret, R., Merle, M.H., This, P., Boursiquot, J.-M. et Cabanis, J.C.: Polymorphisme génétique de la vigne: application à la caractérisation des vins de cépage. 79^e Assemblée générale de l'OIV I, 60–65 (1999).
- 17 Thomas, M.R. and Scott, N.S.: Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86, 985–990 (1993).

Dominique Maigre, Station fédérale de recherches en production végétale de Changins, Centre viticole du Caudoz, CH-1009 Pully