

## La microvigne: un outil novateur pour la recherche et pour l'enseignement de la biologie de la vigne

Markus RIENTH, Axel JAQUEROD, Charles ROMIEU<sup>1</sup> et Laurent TORREGROSA<sup>1</sup>, CHANGINS Haute école de viticulture et œnologie, 1260 Nyon

<sup>1</sup>INRA Montpellier et SupAgro (France)

La vigne est une plante pérenne à cycle reproducteur annuel. Ce fait signifie qu'en climat tempéré, chaque stade de développement de la baie ne peut être observé qu'une fois par an. Comme d'autres plantes pérennes, un autre inconvénient de la vigne est qu'après germination, greffage ou bouturage, elle passe par une phase juvénile d'environ trois ans où elle ne produit pas de raisins. Par ailleurs, la vigne adulte occupe un espace important qui la rend difficilement culti-

vable en grand nombre en serre ou en chambre de culture en conditions contrôlées. Ces caractéristiques desservent les études scientifiques où les paramètres environnementaux doivent être maîtrisés afin de limiter les biais induits par des conditions mal contrôlées. Dans l'enseignement, les travaux pratiques sur le cycle reproducteur sont soumis aux contraintes du calendrier scolaire, ce qui complique leur mise en place et leur suivi en fonction des saisons.

Cet article présente une nouvelle vigne modèle qui permet de contourner ces inconvénients par son système reproducteur à développement précoce et continu et par sa croissance nanifiée. Ces caractères morphologiques (phénotypes) permettent de densifier sa culture en serre ou en phytotrons pour des études scientifiques en conditions environnementales contrôlées. Par ailleurs, ce nouvel outil permettra de mieux enseigner la physiologie de la vigne, et notamment le développement de ses organes reproducteurs (fleurs, baies), indépendamment de la saison.

### Origine de la microvigne

Depuis quelques années, la communauté scientifique viticole étudie un nouveau modèle appelé microvigne (*microvine* en anglais) ou DRCF (*Dwarf, Rapid Cycling and Continuous Flowering* mutant), proposé comme alternative expérimentale à la vigne (Chaib *et al.* 2011).

Ce mutant a été régénéré par embryogenèse somatique à partir de l'épiderme (couche cellulaire L1) du Pinot Meunier (Franks *et al.* 2002). Ce cépage, en effet, possède une couche cellulaire L1, responsable de sa pilosité et porteuse d'une mutation naturelle sur un gène codant pour l'homologue *GAI* d'*Arabidopsis*. La mutation sur le gène *Vv-GAI* confère à la plante une réduction des organes végétatifs (entre-nœuds, feuilles) et convertit les vrilles en inflorescences (Boss et Thomas 2002; fig. 1 et 2).

Chez les plantes supérieures, les méristèmes à l'origine des organes végétatifs et reproducteurs sont organisés en couches cellulaires distinctes se divisant indépendamment. Dans l'apex, on identifie donc une lignée de cellules épidermiques (cellules L1) qui se multiplient par division anticlinale (axe de division perpendiculaire à la surface) pour recouvrir tous les organes vé-



Figure 1 | Comparaison de deux plants de vigne âgés de huit mois: à gauche, variété Portan et, à droite, microvigne (lignée V19). (Photo Laurent Torregrosa, INRA Montpellier).

gétatifs aériens. Au-dessous de celle-ci, une autre couche cellulaire produit des tissus sous-épidermiques (cortex, tissus vasculaires...) par division multi-plans (L2). La couche cellulaire la plus profonde (L3), moins bien délimitée et correspondant au centre des axes végétatifs (moelle), est absente dans les feuilles.

Sauf accident, ces lignes cellulaires ne se mélangent pas. Ainsi, la structure de l'extrémité apicale se retrouve dans tous les organes axillaires qui en dérivent (feuilles, bourgeons...). Lorsqu'on multiplie la vigne végétativement, la même organisation se reproduit chez les descendants végétatifs (boutures, greffes). Les mutations somatiques interviennent au niveau tissulaire et conduisent inévitablement à un organe chimérique. Si la mutation apparaît latéralement sur un méristème, elle peut concerner un secteur d'un organe, c'est une mutation sectorielle. Si elle affecte une cellule initiale (cellule-mère d'une couche), elle peut se répandre au cours du développement de la plante dans l'ensemble des tissus de la couche cellulaire mutée et former une mutation pérclinale comme dans le cas de la microvigne (fig. 3; Torregrosa *et al.* 2015).

### Développement reproducteur

Après la découverte de ce mutant, le premier objectif des chercheurs a été de comparer le développement des systèmes végétatifs et reproducteurs de la microvigne par rapport à la vigne non naine.

Chez la vigne, le développement de la baie de raisin est réparti en deux phases de croissance séparées par une phase d'arrêt appelé plateau herbacé (Coombe et McCarthy 2000).



Figure 2 | Développement reproducteur de la microvigne (feuilles enlevées, axe plié pour les besoins de la photographie) (Photo Laurent Torregrosa, INRA Montpellier).

La première phase de croissance est notamment due à la multiplication cellulaire et à l'élargissement vacuolaire lié au stockage des acides organiques (acide tartrique et acide malique) comme osmolytes majeurs (Ojeda *et al.* 1999). Durant la phase suivante, le plateau herbacé, la croissance de la baie s'arrête, ainsi que l'accumulation des acides organiques. La transition entre le plateau herbacé et la phase de maturation est appelée véraison. C'est la reprise de l'agrandissement de la baie qui se traduit par un bref ramollissement (environ 24 heures) et une brusque reprogrammation du transcriptome de la baie (Terrier *et al.* 2005). Durant cette courte période, l'accumulation des sucres s'accélère et la dégradation de l'acide malique est déclenchée. Durant la phase suivante, généralement appelée maturation, la croissance de la baie se poursuit par l'accumulation des sucres et l'importation d'eau qui induit l'agrandissement cellulaire (Ojeda *et al.* 1999). L'accumulation des sucres, la dégradation de l'acide malique, la synthèse et l'accumulation de certaines substances aromatiques et des anthocyanes (pigments rouges) se poursuivent jusqu'à la maturité. L'acide tartrique n'est pas métabolisé durant la maturation, mais reste en quantité constante. La diminution de sa concentration par kilogramme ou litre, constatée lors des contrôles de maturité, est une conséquence de l'augmentation du volume de la baie. De son côté, l'acide malique diminue en quantité par baie et en concentration car il est métabolisé.

La phase de maturation dure 40 à 60 jours à l'échelle d'une grappe, mais seulement une quinzaine de jours à l'échelle d'une baie. Ce phénomène est lié à la très

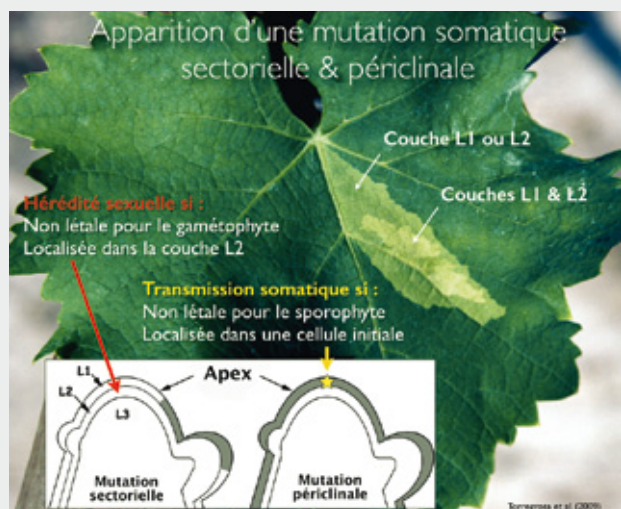


Figure 3 | Schéma de l'organisation du méristème apical dans l'apex de la vigne et phénotype d'une mutation affectant la synthèse de la chlorophylle dans une feuille (d'après Torregrosa *et al.* 2009, extrait de Torregrosa et Carboneau, 2015).

grande variabilité régnant à l'intérieur de la grappe due au déclenchement différé de la floraison et de la véraison. Cette dynamique doit être considérée lors des contrôles de maturité avant récolte (Coombe et McCarthy 2000; Rienth *et al.* 2016).

Pour la validation du modèle, il convenait donc de vérifier si le système reproducteur de la microvigne correspondait à celui de la vigne non naine. Dix microvignes ont été cultivées en conditions contrôlées en serre (température 30°C/22°C jour/nuit, photopériode 14h, VPD 1kPa, PAR 400mmol/m<sup>2</sup>.s). Un échantillonnage a été effectué lorsque les premières baies ont été considérées comme mûres à la base de l'axe principal des plantes. Une analyse des principaux composés de la baie (acide malique, acide tartrique, sucres, proline) a été effectuée.

L'échantillonnage des organes reproducteurs présents (de la nouaison à la maturité) a été effectué au même moment sur toutes les plantes. Pour normaliser

les stades de développement entre plantes, une conversion spatiale/temporelle de chaque phytomère (position de la grappe à partir de la base) a été calculée en tenant compte de la vitesse de croissance (*leaf emergence rate* - LER) et du temps thermique (TT<sub>day</sub>) selon la formule:

$$\text{Age de l'organe} = ((1 \div \text{LER}) \div \text{TT}_{\text{day}}) \times \text{index phytométrique}$$

La figure 4 montre que les composés biochimiques évoluent de la même manière que dans une vigne non naine (Conde *et al.* 2007). Ainsi, juste après la nouaison (N), l'acide malique est accumulé jusqu'au plateau herbacé pendant environ 40 jours, ce qui correspond à la première phase de croissance de la baie. Après le plateau herbacé, la dégradation de l'acide malique se déclenche en même temps que l'accumulation des sucres et de l'acide aminé proline, souvent utilisé comme indicateur de maturité.

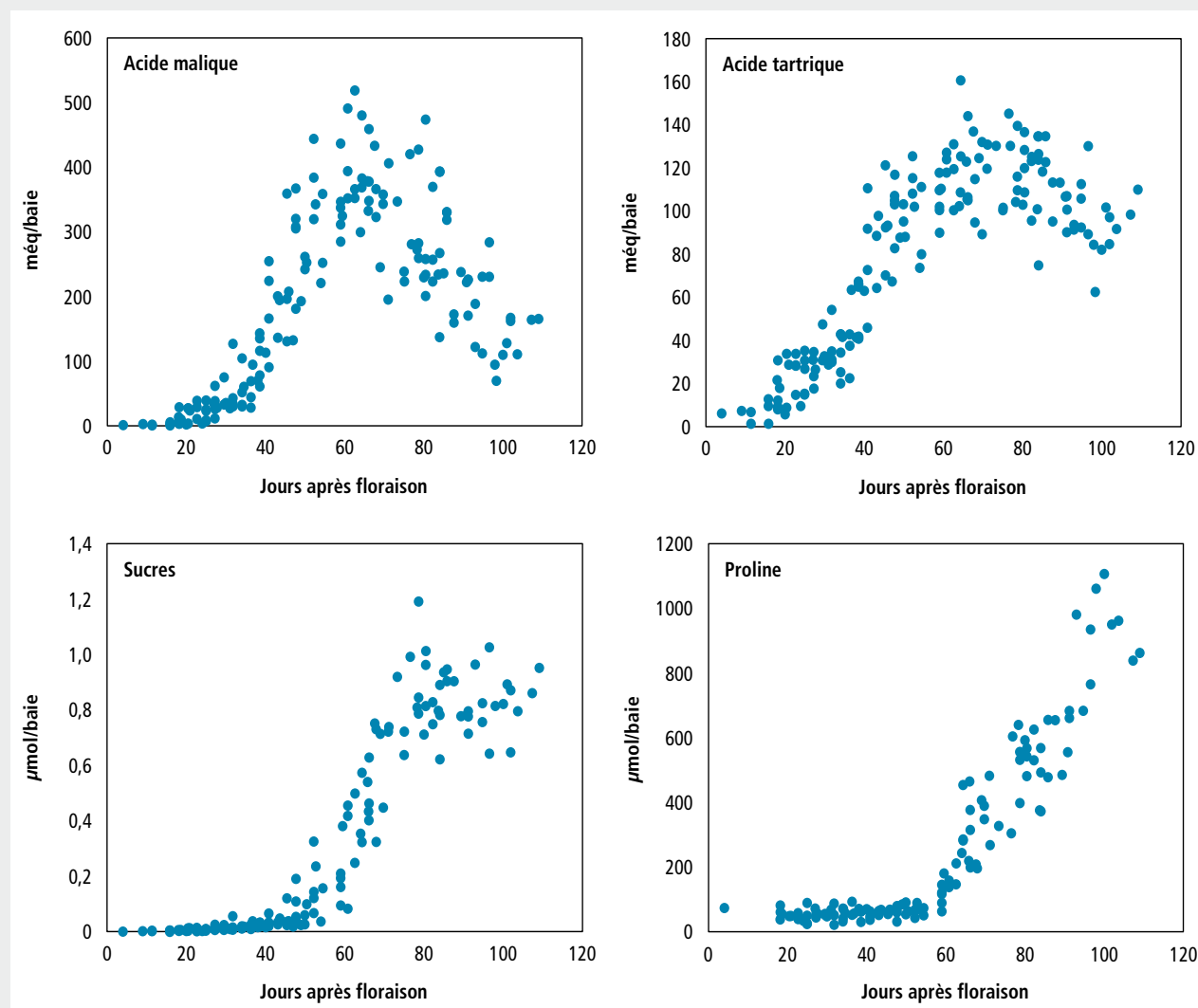


Figure 4 | Evolution des principaux composés de la baie de microvigne en fonction du temps calculé à partir de la position spatiale des grappes.



De son côté, l'acide tartrique est également accumulé pendant la première phase de croissance et sa quantité reste constante durant la phase de maturation. Une diminution intervient toutefois à la fin de la maturation, due au léger flétrissement des baies. A la phase plateau herbacé, les deux acides totalisent environ  $500 \mu\text{Eq}$ , comme dans une grappe de vigne non naine. L'accumulation des sucres est déclenchée à partir de la véraison et se poursuit environ jusqu'au stade où le flux phloémien est fortement ralenti et la quantité de sucres par baie reste constante.

### Conclusions

Cette étude montre que, pour un phytomère donné, le développement des raisins de la microvigne est similaire à celui d'une vigne non naine cultivée au champ. Compte tenu de ses avantageuses propriétés biologiques (faible encombrement, fructification continue, possibilité d'inférer des observations temporelles à partir de données spatiales), ce modèle peut être utilisé dans des études fondamentales sur la physiologie du fruit en conditions contrôlées. La microvigne a déjà constitué le matériel végétal de base de plusieurs expérimentations scientifiques portant sur les variations d'expression génique (Rienth *et al.* 2014a) dans le raisin et sur leurs réponses à des températures élevées (Rienth *et al.* 2012; 2014b; 2016). Ce modèle a également montré son potentiel pour accélérer les travaux de génétique (Chaib *et al.* 2010), notamment l'identification de déterminants génétiques (QTL: *quantitative trait locus*) du développement, peu sensibles aux conditions thermiques fluctuantes (Houel *et al.* 2015). De futures expérimentations sur l'impact des facteurs physiques (sécheresse, concentration en  $\text{CO}_2$ , température, etc.) sur la qualité des baies sont possibles, ainsi que des études sur l'interaction hôtes x pathogènes à plusieurs stades de développement en conditions expérimentales bien contrôlées. ■

### Bibliographie

- Boss P. K. & Thomas M. R., 2000. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**, 847–850.
- Chaib J., Torregrosa L., Mackenzie D., Corena P., Bouquet A. & Thomas M. R., 2010. The grape microvine – a model system for rapid forward and reverse genetics of grapevines. *Plant Journal* **62** (6), 1083–92.
- Conde C., Silva P., Fontes N., Dias A. C. P., Tavares R. M., Sousa M. J. & Gerós H., 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* **1** (1), 1–22.
- Coombe B. G. & McCarthy M. G., 2000: Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 131–135.
- Franks T., Botta R. & Thomas M. R., 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 192–199.
- Houel C., Chatbanyong R., Doligez A., Rienth M., Foria S., Luchoire N. & Torregrosa L., 2015. Identification of stable QTLs for vegetative and reproductive traits in the microvine (*Vitis vinifera* L.) using the 18 K Infinium chip. *BMC Plant Biology* **15** (1), 205.
- Ojeda H, Deloire A., Carbonneau A., Ageorges A. & Romieu C., 1999. Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* **38**, 145–150.
- Rienth M., Torregrosa L., Kelly M. T., Luchoire N., Pellegrino A., Grimplet J. & Romieu C., 2014. Is Transcriptomic Regulation of Berry Development More Important at Night than During the Day? *PLoS One* **9** (2). doi: 10.1371/journal.pone.0088844.
- Rienth M., Torregrosa L., Luchoire N., Chatbanyong R., Lecourieux D., Kelly M. & Romieu C., 2014. Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. *BMC Plant Biology* **14** (1), 108.
- Rienth M., Dauzat M., Pellegrino A., Lopez G., Torregrosa L. & Romieu C., 2012. First observations of the microvine development under 100 % LED (light emitting diodes) illumination. *Vitis* **51** (4), 167–173.
- Rienth M., Torregrosa L., Gautier S., Ardisson M., Brillouet J. M. & Romieu C., 2016. Temperature desynchronizes sugar and organic acid metabolism in ripening grapevine fruits and remodels its transcriptome. (submitted, *BMC Plant Biology*).
- Terrier N., Glissant D., Grimplet J., Barriè F., Abbal P., Couture C., Ageorges A., Atanassova R., Leon C., Renaudin J.-P. *et al.*, 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry development. *Planta* **222**, 832–847.
- Torregrosa L., 2009. Extrait de Carbonneau A., Deloire A., Torregrosa L., Jaillard B., Pellegrino A., Méty A. et Abbal P. (eds). *Traité de la Vigne*. Editions Dunod, Paris.