

Caractérisation génétique de la variété «Petite poire à grappe» utilisée pour la production de Poire à Botzi AOP

Nicolas GARNIER¹, Dominique RUGGLI², Julien CROVADORE¹, Bastien COCHARD¹, Romain CHABLAIS¹ et François LEFORT¹

¹ Groupe Plantes et pathogènes, Institut Terre-Nature-Environnement (inTNE), Haute Ecole du paysage, d'ingénierie et d'architecture (hepia), HES-SO Genève, 1254 Jussy, Suisse

² Centre de conseils agricoles, Institut agricole de l'Etat de Fribourg, 1725 Posieux, Suisse

Renseignements: François Lefort, tél. +41 22 546 68 27, e-mail: francois.lefort@hesge.ch



Poirier basse-tige de la variété *Petite poire à grappe*. (Photo: Dominique Ruggli)

Introduction

Connue sur le territoire du canton de Fribourg depuis désormais plusieurs siècles, la Poire à Botzi était traditionnellement cultivée sous forme d'arbres haute-tige. Aujourd'hui, elle est toujours produite à partir de la variété *Petite poire à grappe*, mais dans des vergers en haies fruitières afin de répondre à certains critères de

qualité visuelle et gustative du cahier des charges de l'AOP. La production de cette petite poire d'un calibre compris entre 35 et 55mm représente des volumes annuels oscillant entre 30 et 70 tonnes de fruits AOP, qui sont cultivés sur 4,4 ha (Winckler 2016). La filière est aujourd'hui composée de 24 producteurs de poires fraîches, 5 transformateurs de fruits en conserves et 3 pépinières produisant des jeunes arbres. L'Union frui-

tière fribourgeoise en est l'interprofession et c'est elle qui a initié et soutenu ce projet.

A l'heure actuelle, la préservation de la diversité génétique des arbres fruitiers est un enjeu important afin de bénéficier de ressources génétiques variées pour la création de nouvelles variétés (Sehic *et al.* 2012). Pour conserver efficacement ce patrimoine comme la *Petite poire à grappe*, des collections d'anciennes variétés locales ont été mises en place en Suisse romande par l'association Rétropomme dans le cadre du Plan d'action national pour la conservation et l'utilisation durable des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (PAN-RPGAA) en cours depuis 1999 (OFAG 2011). La principale méthode permettant de différencier une variété d'une autre est la caractérisation pomologique, se basant sur l'observation de caractères morphologiques, donc sur le phénotype. Pourtant, ces caractères sont soumis aux conditions environnementales et peuvent différer selon l'emplacement géographique des cultures. Ainsi, l'apparition des méthodes d'identification moléculaire a permis de vérifier l'identité des individus conservés dans de nombreuses collections nationales en Europe et dans le reste du monde (Pina *et al.* 2014).

Aujourd'hui, ce sont les marqueurs moléculaires de type microsatellite qui sont les plus utilisés en raison de leur précision, afin d'établir et de comparer des empreintes génétiques de différentes espèces ou variétés de poires (Öztürk et Demirsoy 2016). En 1995, Peter Enz avait démontré au Jardin botanique de Fribourg, grâce à des méthodes pomologiques, que les différents phénotypes observés chez les producteurs de Poire à Botzi AOP étaient liés à la variabilité des conditions environnementales et culturelles (Winckler 2016). C'est dans ce contexte que l'Union fruitière fribourgeoise a décidé de vérifier à l'aide de méthodes d'identification génétiques modernes qu'il n'existait bel et bien qu'un seul génotype de *Petite poire à grappe*.

Matériel et méthodes

Lieux de collecte

La première étape de cette étude a consisté à définir quels individus de *Petite poire à grappe* allaient être échantillonnés afin de représenter au mieux la diversité génétique potentielle de cette variété. La sélection s'est appuyée sur six groupes distincts d'échantillons:

1. Dix producteurs répartis sur les différentes zones de l'aire géographique de l'AOP ont été choisis. Sur chacune des parcelles, trois individus ont été collectés pour chaque date de plantation.

Résumé La Poire à Botzi est le seul fruit frais à bénéficier aujourd'hui en Suisse d'une appellation d'origine protégée (AOP). Cette poire est produite à partir de la variété *Petite poire à grappe* et donne des fruits de petit calibre de différentes couleurs qui se récoltent à partir du mois d'août. Il s'agit d'une ancienne variété de poire cultivée dans le canton de Fribourg, se consommant sous forme de poires cuites, notamment lors de la fête traditionnelle de la Bénichon. La caractérisation génétique de cette variété a été réalisée à l'aide de marqueurs microsatellites sur des individus provenant de l'ensemble du territoire couvert par l'AOP (vergers basse-tige, pépinières, arbres haute-tige traditionnels). Cette étude a permis d'évaluer la diversité génétique de cette variété de poire et a révélé qu'il n'existe qu'un seul génotype de *Petite poire à grappe*, exprimant plusieurs phénotypes selon les conditions environnementales.

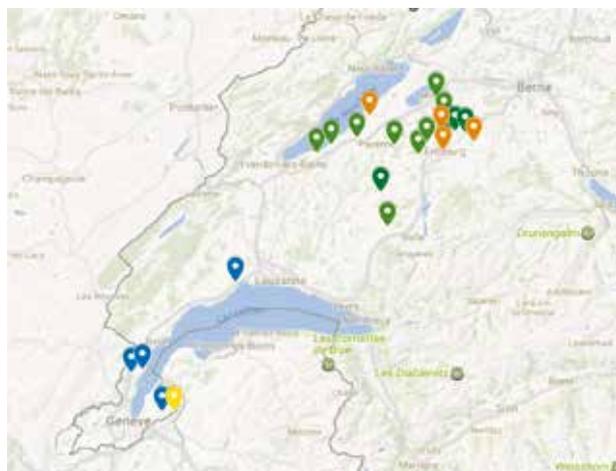


Figure 1 | Représentation géographique des points de collecte (en vert clair les producteurs, en vert foncé les pépiniéristes, en orange les arbres haute-tige, en jaune la collection de poire à rissoles de Lullier, en bleu les témoins)

2. Des rameaux en provenance des trois pépinières agréées à fournir des rameaux de la variété *Petite poire à grappe* ont aussi été collectés afin de savoir si les greffons fournis aux producteurs étaient tous identiques.
3. Quatre arbres haute-tige traditionnels âgés jusqu'à 100 ans et situés dans les cantons de Fribourg et Vaud

ont été mis en évidence. Ils ont permis de comparer si la variété désormais cultivée en verger basse-tige correspondait à la variété historiquement cultivée.

4. Des greffons issus de l'arbre de référence pour la multiplication de la variété *Petite poire à grappe* ont été gracieusement fournis par le Conservatoire national suisse des arbres fruitiers (Wädenswil) dans le but de comparer les profils génétiques des échantillons précédents avec une référence connue.
5. Les variétés commerciales Passe-Crassane, William's, Comice, Conférence, Abbé Fétel provenant de la collection du Centre de formation professionnelle nature et environnement (Lullier, Genève), ainsi qu'une variété de poire asiatique Hosui (verger Syngenta, Coppex) ont servi de témoins dans cette étude.
6. Enfin, une collection de poire à rissoles genevoises (Centre de formation professionnelle nature et environnement, Lullier, Genève), dont les fruits possèdent des caractéristiques morphologiques proches de ceux de la variété *Petite poire à grappe*, a été échantillonnée. Cela a permis de vérifier si ces deux types de poire possédaient un patrimoine génétique commun.

Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué à partir du stade bouton vert (BBCH 56) (Bloesch et Viret 2013), c'est-à-dire à partir du 10 avril 2018 dans les régions les plus précoces, comme sur la rive sud du lac de Neuchâtel. Au total, 84 échantillons ont été recueillis et répertoriés en fonction du lieu de collecte, de l'altitude, de l'âge de la parcelle, de la pépinière qui a fourni les plants, de la couleur des fruits cultivés ou encore de la période de maturité. Sur chaque parcelle de producteur ou pépiniériste, un rameau portant au moins dix feuilles a été prélevé sur

trois individus différents et pour chaque date de plantation. Pour les autres échantillons (arbres haute-tige, témoins, collection de poire à rissoles) un seul rameau a été prélevé par arbre. Les rameaux ont été placés en jauge à température ambiante, jusqu'à débourrement des feuilles. Les feuilles et bourgeons débouffés échantillonnés ont ensuite été congelés à -80°C.

Profilage génétique

Extraction de l'ADN

L'ADN des feuilles de poiriers a été extrait selon la microméthode de Lefort et Douglas (1999) avec ajout de β -mercaptoéthanol à 1%. Typiquement, l'échantillon de feuille ou de bourgeon débouffé de 100 mg a été broyé au pilon sous azote liquide dans un mortier stérile. Selon le protocole, 1 ml de tampon et 100 μ L β -mercaptoéthanol sont ajoutés à 100 mg de broyat puis incubés à 65°C pendant 15 min. Après extraction avec 700 μ L de chloroforme: isoamyl alcool (29:1). La phase aqueuse contenant l'ADN est soigneusement récupérée après centrifugation et l'ADN précipité par ajout d'isopropanol à 50% de concentration finale. L'ADN précipité est lavé avec de l'éthanol 70%, puis solubilisé dans 100 μ L d'eau ultra pure avant d'être analysé quantitativement et qualitativement à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop.

Choix d'un set de marqueurs microsatellites

Le choix d'un set de dix marqueurs microsatellites (tabl. 1) a été réalisé en considérant les publications les plus récentes ayant utilisé un set de marqueurs développés par le programme européen European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR). Ces marqueurs sont les plus précis actuellement, car ils permettent des comparaisons fiables avec des études similaires. D'autres marqueurs existent et sont tout

Locus microsatellite	Groupe de priorité	Amorce sens	Amorce antisens
CH01d08	1a	CTCCGCCGCTATAAACTTC	TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG
CH01d09	2	GCCATCTGAACAGAATGTGC	CCCTTCATTACATTTCCAG
CH01f07a	1a	CCCTACACAGTTTCTCAACCC	CGTTTTGGAGCGTAGGAAC
CH03d12	3	GCCGAGAAGCAATAAGTAAACC	ATTGCTCCATGCATAAAGGG
CH03g07	1a	AATAAGCATTCAAAGCAATCCG	AATAAGCATTCAAAGCAATCCG
CH04e03	3	TTGAAGATGTTGGCTGTGC	TGCATGTCTGTCTCCTCCAT
CH05c06	1b	ATTGGAAGTCTCCGTATTGTGC	ATCAACAGTAGTGGTAGCCGGT
EMPC11	1b	GCGATTAAAGATCAATAAACCCATA	AAGCAGCTGGTTGGTGAAT
EMPC117	1b	GTTCTATCTACCAAGCCACGCT	CGTTTGTGTGTTTACGTGTG
GD147	2	TCCCGCCATTTCTCTGC	AAACCGCTGCTGCTGAAC

Tableau 1 | Marqueurs microsatellites sélectionnés appartenant aux trois groupes prioritaires recommandés par l'ECPGR (nom, groupe de priorité, amorce sens, amorce antisens) (d'après Sehic *et al.*, 2012)

aussi informatifs mais, du fait de leur utilisation peu fréquente, ils ne permettent pas la comparaison du profil génétique d'une même référence pour plusieurs études (Suprun *et al.* 2016; Urrestarazu *et al.* 2015). Les dix marqueurs retenus pour cette étude et présentés dans ce tableau appartiennent aux trois groupes prioritaires recommandés par l'ECPGR (Sehic *et al.* 2012).

Amplification et détection

La réaction en chaîne de la polymérase (RCP) a été réalisée selon les conditions établies par le protocole d'harmonisation de l'utilisation du set de marqueurs microsatellites de l'ECPGR (Evans *et al.* 2007): Ces conditions ont été adaptées selon les recommandations de Suprun *et al.* (2016). Elles comprennent une dénaturation initiale à la température de 95°C pendant 3 min, suivie d'un cycle de 95°C pendant 30 sec, 58°C pour la température d'hybridation pendant 30 sec et 72°C pendant 15 sec, cycle qui est répété 38 fois. Enfin, l'extension finale est réalisée à 72°C pendant 1 min et la réaction se termine par une étape continue à 4°C.

L'analyse des 840 produits d'amplification obtenus a été conduite dans un système d'électrophorèse capillaire automatisé (Fragment analyser, Labgene) permettant de visualiser et d'enregistrer les tailles des produits d'amplification en nombre de paires de bases. Les électrophorégrammes numériques et les courbes de séparation de chacun des fragments d'ADN en présence pour chaque locus microsatellite ont été obtenus avec une résolution de ± 1 paire de bases. Chacune de ces courbes a ensuite été visualisée avec le logiciel Pro-Size 3.0 afin de pouvoir compiler manuellement, par lecture des courbes, les profils génétiques des 84 accessions incluses dans cette étude.

Résultats et discussion

On remarque que tous les individus de *Petite poire à grappe* possèdent un profil allélique similaire à ± 1 paire de base. On observe également que pour trois des dix marqueurs employés, la variété présente un caractère triploïde. Les poires à rissoles genevoises présentent aussi ce caractère triploïde, mais pour quasiment la totalité des marqueurs, soit neuf microsatellites sur dix. Au total, 117 allèles différents ont été comptabilisés pour dix loci et 84 accessions.

Afin de confirmer les valeurs des profils mis en évidence, les profils des variétés commerciales (témoins) de cette étude ont été comparés avec ceux obtenus dans quatre autres études. On observe que les différences pour une même variété sont du même ordre de grandeur que pour ces quatre études, c'est-à-dire le

plus souvent autour de 10 pb. Ces variations sont liées notamment aux différents systèmes de séparation utilisés par les laboratoires.

Similarité génétique

Arbre phylogénétique par méthode UPGMA

La méthode UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) permet de construire des arbres phylogénétiques en regroupant des individus génétiquement proches dans les mêmes clades (Perrière et Brochier 2010). Cette méthode a été appliquée à l'aide du logiciel NTSYSpc sur les données moléculaires converties au format binaire, soit une matrice rectangulaire. Ensuite, une matrice de similarité a été calculée en utilisant le coefficient de Dice et a permis de réaliser le regroupement des individus similaires en clades.

Lorsque l'on observe le dendrogramme (fig. 2), tous les individus de *Petite poire à grappe* échantillonnés sont regroupés dans le même clade. Quelle que soit l'origine des arbres (producteurs, pépiniéristes, arbres de référence pour la multiplication ou arbres haute-tige), tous les individus sont identiques et ont donc été classés ensemble par l'algorithme. Cet arbre phylogénétique vient donc confirmer ce que nous avons précédemment observé, tous les profils génétiques obtenus pour les échantillons de *Petite poire à grappe* sont semblables, ce qui confirme l'uniformité génétique du matériel végétal de la variété décrite dans le cahier des charges AOP Poire à Botzi (OFAG 2014). Cette analyse a également mis en évidence que les poires à rissoles comme les variétés commerciales sont similaires à seulement 27% avec la variété *Petite poire à grappe*, ce qui suggère une origine génétique distincte de cette variété.

Les cinq variétés commerciales de *Pyrus communis* étudiées sont relativement proches les unes des autres, avec une similarité génétique d'environ 42%. La poire asiatique ou nashi (*Pyrus pyrifolia*) a été utilisée comme groupe externe à l'espèce *Pyrus communis* dans ce dendrogramme.

En ce qui concerne les poires à rissoles genevoises, trois sous-populations ont été mises en évidence (*Loup pop 1*, *Loup pop 2*, *Marlioz*). Il y a donc une variabilité génétique entre les différents individus de poires à rissoles genevoises étudiés. On observe que les poires à rissoles genevoises sont finalement génétiquement bien distinctes de la variété *Petite poire à grappe*, mais aussi assez distinctes entre elles

Analyse en coordonnées principales (PCoA)

Cette méthode d'analyse de données permet de visualiser les corrélations entre des variables ou des

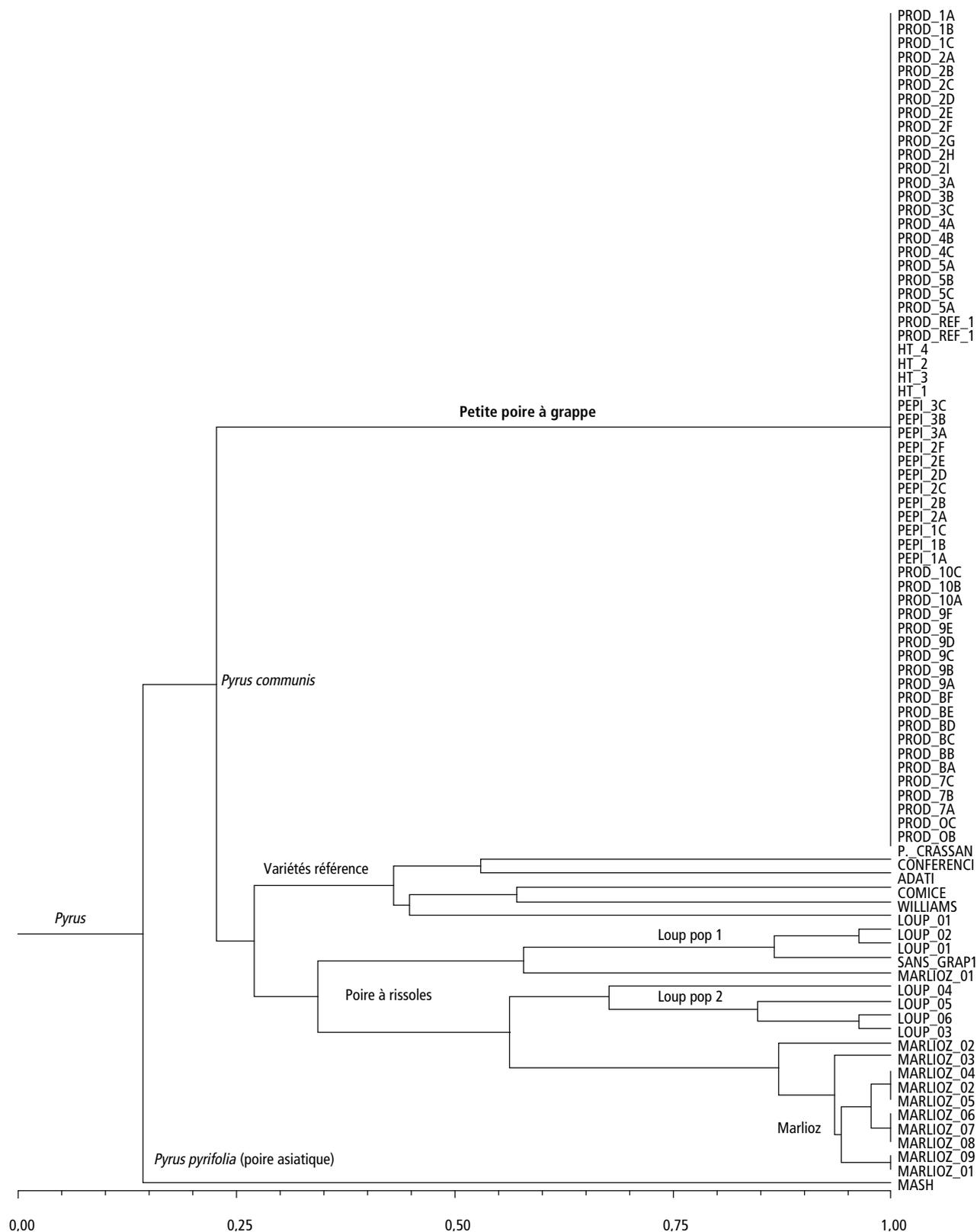


Figure 2 | Dendrogramme obtenu par méthode UPGMA (coefficient de similarité en X).

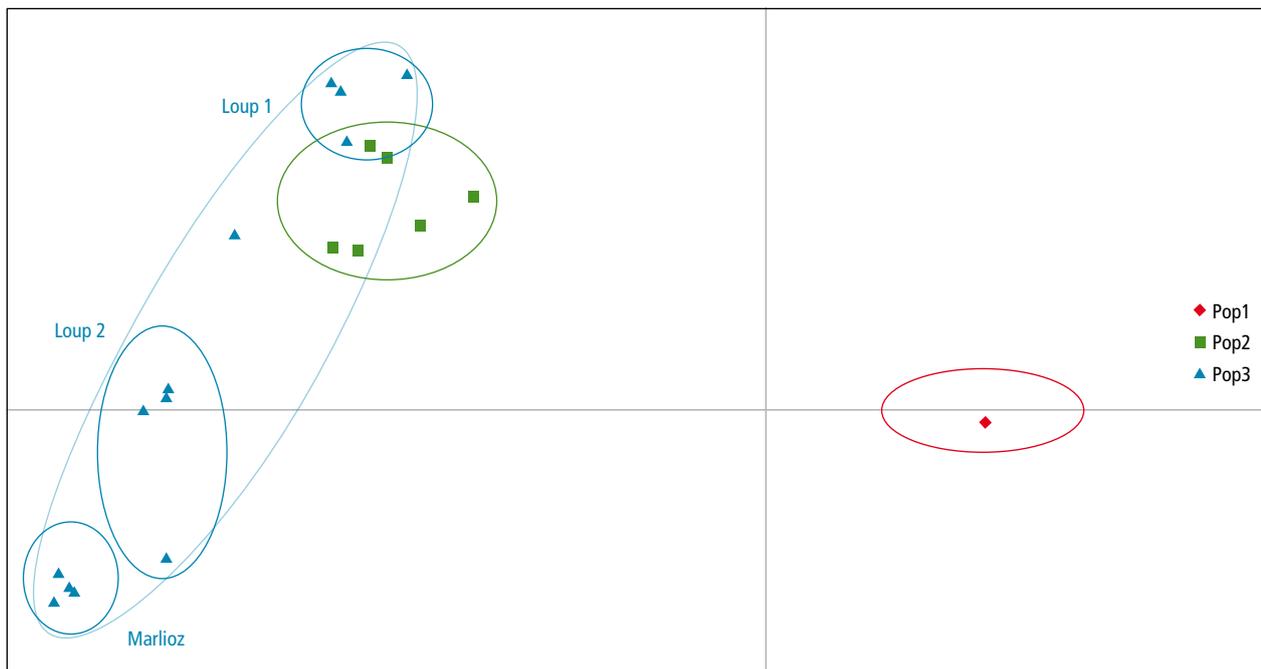


Figure 3 | Représentation graphique de l'analyse en coordonnées principales (PCoA) réalisée sur les 84 profils génétiques obtenus. Pop1 (rouge) Petite poire à grappe, Pop2 (vert) Variétés commerciales de référence, Pop3 (bleu) Poire à rissoles genevoises, avec les sous-populations en violet.

observations dans un espace géométrique à deux ou trois dimensions afin d'identifier les groupes homogènes. A partir de la matrice rectangulaire au format binaire, une matrice de distance génétique basée sur le coefficient de Pearson a été créée avec le logiciel GenAlEx 6.5 et a permis de réaliser cette analyse (fig. 3).

On observe comme précédemment que tous les individus de *Petite poire à grappe* sont très similaires, car le nuage de points est concentré sur les mêmes coordonnées X, Y pour les 60 individus constituant la population 1, en rouge. Cette population est également éloignée dans l'espace par rapport aux autres populations, ce qui illustre la distance génétique entre les Poire à Botzi AOP, les variétés commerciales et les poires à rissoles. Le graphique illustre à nouveau le fait que les poires à rissoles sont plus proches des variétés commerciales au niveau génétique que de la variété *Petite poire à grappe*. Au vu de la morphologie du fruit relativement commune entre la Poire à Botzi AOP et les poires à rissoles, on s'attendait à ce que les deux populations partagent un certain nombre d'allèles semblables, ce qui n'a pas été le cas.

Cette analyse a permis de retrouver facilement au niveau visuel les différents clades mis en évidence par le dendrogramme. Les deux sous-populations de poires à rissoles de type *Loup* sont plus proches

des variétés commerciales que la sous-population de poires de type *Marlioz*, qui en est plus éloignée.

Concernant les variétés commerciales de référence, on observe qu'elles partagent un certain nombre d'allèles, puisqu'elles sont représentées graphiquement par un nuage de points peu dispersés. Enfin, par rapport à la poire asiatique, on aurait pu s'attendre à la retrouver plus éloignée des autres variétés commerciales, comme observé dans le dendrogramme, mais ce n'est pas le cas. Il s'agit certainement ici de la limite de précision de cette méthode, qui est conçue pour la comparaison entre groupes plutôt qu'entre individus.

Conclusion

En produisant les profils génétiques d'arbres échantillonnés chez les pépiniéristes et chez près de la moitié des producteurs de Poire à Botzi AOP, cette étude génétique a pu mettre en évidence l'homogénéité de la population existante de *Petite poire à grappe* quelle que soit l'origine des arbres. Il n'existe qu'un seul génotype de *Petite poire à grappe* cultivé et reproduit. Les différentes couleurs de fruits observées dépendent certainement des conditions environnementales comme l'altitude ou l'état de maturité à la récolte, même si l'existence de mutations somatiques

accumulées ne peut être écartée. L'étude a également montré que tous les individus échantillonnés sont bien issus de la variété *Petite poire à grappe* recommandée dans le cahier des charges de l'AOP Poire à Botzi. Les résultats montrent donc une utilisation correcte de la variété dans le cadre de cette AOP qui a fêté ses dix ans lors de l'édition 2018 de la Bénichon du Pays de Fribourg à Estavayer-le-Lac. ■

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce à la collaboration des producteurs et pépiniéristes qui ont fourni le matériel végétal nécessaire pour les analyses génétiques.

Nous adressons également nos remerciements à l'Union fruitière fribourgeoise, qui a lancé et soutenu financièrement ce projet.

Bibliographie

- Bloesch B. & Viret O., 2013. Stades phénologiques repères des fruits à pépins (pommiers et poiriers). *Rev. Suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **45** (2), 128-131.
- Perrière G. & Brochier-Armanet C., 2010. Concepts et méthodes en phylogénie moléculaire. Collection Iris, Springer Verlag, Paris, 250 p.
- Evans K.M., Fernandez-Fernandez F. & Govan C., 2007. Harmonising fingerprinting protocols to allow comparisons between germplasm collections-*Pyrus*. *Acta Hortic.* **814**,103-106.
- Lefort F. & Douglas G.C., 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Ann. For. Sci.* **56**, 259-263.
- OFAG, 2014. Cahier des charges Poire à Botzi, Registre des appellations d'origine et des indications géographiques. Adresse: www.blw.admin.ch
- OFAG, 2011. Présentation de l'association Rétropomme. Conservation des ressources phyto-génétiques, base de données nationale suisse. Adresse: <https://www.bdn.ch/groups/retropomme/pages/presentation>
- Öztürk A. & Demirsoy L., 2016. Evaluation of relationships between pear genotypes from North Anatolia, Turkey using SSR markers. *Acta Hortic.* **1139**, 49-56.
- Pina A., Urrestarazu J. & Errea P., 2014. Analysis of the genetic diversity of local apple cultivars from mountainous areas from Aragon (Northeastern Spain). *Sci. Hortic.* **174**, 1-9.
- Sehic J., Garkava-Gustavsson L., Fernandez-Fernandez F. & Nybom H., 2012. Genetic diversity in a collection of European pear (*Pyrus communis*) cultivars determined with SSR markers chosen by ECPGR. *Sci. Hortic.* **145**, 39-45.
- Suprun I.I., Tokmakov S.V., Bandurko I.A. & Il'nitskaya E.T., 2016. SSR polymorphism of modern cultivars and autochthonous forms of the pear tree from North Caucasus. *Russ. J. Genet.* **52**, 1149-1156.
- Urrestarazu J., Royo J.B., Santesteban L.G. & Miranda C., 2015. Evaluating the Influence of the microsatellite marker set on the genetic structure inferred in *Pyrus communis* L. *PLOS One* **10**(9), e0138417.
- Winckler A., 2016. La sublime poire à Botzi AOP. Confrérie de la poire à Botzi, Fribourg, 36 p.

Summary**Genetic profiling of the variety “Petite poire à grappe” used for the production of “Poire à Botzi AOP”**

Poire à Botzi is currently the only fresh fruit variety to benefit in Switzerland from a protected designation of origin (AOP). This pear is produced from the variety *Petite poire à grappe* and gives small sized fruits of different colors, harvested in August. It is an old variety, which is growing in the Canton of Fribourg, and is usually consumed as cooked pears, especially during the traditional popular festival of Bénichon. The genetic characterization of this variety was carried out using 10 microsatellite markers on individuals sampled throughout the whole territory covered by the protected designation of origin (production trees, nurseries, traditional high-stem trees). This study allowed for the genetic profiling of this pear variety and revealed that there is only one *Petite poire à grappe* genotype expressing several phenotypes according to environmental conditions.

Key words: Genetic profiling, pear, microsatellites

Zusammenfassung**Genetische Charakterisierung der Sorte *Petite poire à grappe* die verwendet wird für die Ursprungsbezeichnung Poire à Botzi AOP**

Die Poire à Botzi ist die einzige frische Frucht, die heute in der Schweiz von der Ursprungsbezeichnung AOP profitiert. Diese Birne wird aus der Sorte *Büschelbirne* (auf Französisch *Petite poire à grappe*) produziert. Sie bildet kleine Früchte mit verschiedenen Farben und wird ab August geerntet. Es handelt sich um eine alte, im Kanton Freiburg angebaute Birnensorte, die in Form gekochter Birnen verzehrt wird, insbesondere während des traditionellen Kilbi-Festes. Die genetische Charakterisierung dieser Sorte wurde unter Verwendung von Mikrosatelliten-Markern an Individuen aus dem gesamten AOP Gebiet (Niederstammanlagen, Baumschulen, Hochstammbäume) durchgeführt. Diese Studie untersuchte die genetische Vielfalt dieser Birnensorte und zeigte, dass es nur einen einzigen Genotyp von der Sorte *Büschelbirne* gibt, der je nach Umweltbedingungen mehrere Phänotypen exprimiert.

Riassunto**Caratterizzazione genetica della varietà pera Botzi utilizzata per la produzione di pere a Botzi DOP**

La pera Botzi è oggi l'unico frutto fresco in Svizzera ad avere una Denominazione d'Origine Protetta (DOP). Questa pera è prodotta dalla varietà “Petite poire à grappe” e dà frutti di piccolo calibro di diversi colori ed è raccolta a partire dal mese di agosto. È una vecchia varietà di pera coltivata nel Canton Friburgo, consumata sotto forma di pere cotte, specialmente durante la tradizionale festa della Bénichon. La caratterizzazione genetica di questa varietà è stata effettuata utilizzando marcatori microsatellitari su individui provenienti dall'intero territorio coperto dalla DOP (frutteti a basso fusto, vivai, alberi ad alto fusto tradizionali). Questo studio ha valutato la diversità genetica di questa varietà di pere e ha rivelato che esiste un solo genotipo di “Petite poire à grappe” che esprime diversi fenotipi in base alle condizioni ambientali.