

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin, Inra de Colmar

THÈSE présentée par :

Marion DELAME

soutenue le : **26 septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences agronomiques

**RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE ET TRANSMISSION DE
CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES,
PHÉNOLOGIQUES ET MÉTABOLIQUES
DANS LES HYBRIDES INTERSPÉCIFIQUES ENTRE
VITIS VINIFERA ET MUSCADINIA ROTUNDIFOLIA**

THÈSE dirigée par :

M. MERDINOGLU Didier

Directeur de recherche, Inra (Colmar)

RAPPORTEURS :

Mme CHÈVRE Anne-Marie

Directrice de recherche, Inra (Le Rheu)

Mme FAIVRE-RAMPANT Patricia

Chargée de recherche, Inra (Evry)

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. SCHALLER Hubert

Directeur de recherche, CNRS (Strasbourg)

“Où il y a de la vie, il y a de l'espoir.”

Miguel de Cervantès, *Don Quichotte* (1605)

Remerciements

Avant toutes choses, je tiens à remercier les membres de mon jury Anne-Marie Chèvre, Patricia Faivre-Rampant et Hubert Schaller pour avoir accepté d'évaluer mon travail pendant cette période estivale.

Je remercie également Julie Fievet et Emilce Prado pour leur participation, avec Patricia Faivre-Rampant, à mes comités de thèse et dont les conseils m'ont été précieux pour l'avancée de mon travail.

Money rules the World, même dans le monde de la recherche, je suis donc reconnaissante envers tous ceux sans qui cette thèse n'aurait pas pu voir le jour : les membres du CGAER pour m'avoir autorisée à réaliser ma FCPR, AgroParisTech pour m'avoir financée et la Fondation Poupelain pour avoir financé mes travaux.

Merci également à Didier Merdinoglu, mon directeur de thèse, pour son encadrement, ses explications et surtout ses corrections poussées du manuscrit et des articles.

Un grand merci à tous mes collègues de l'Inra de Colmar, et notamment ceux des équipes Génétique et Amélioration de la Vigne et Métabolisme Secondaire de la Vigne, pour la bonne ambiance, le soutien et l'aide que vous m'avez fourni au cours de ces trois années. Merci à Patricia et Raymonde pour l'aide et la réalisation des analyses en chromatographie, et surtout pour votre patience lors des explications, vous m'avez réconciliée avec la chimie. Merci à Nathalie pour ton aide conséquente et utile pour les extractions de baie et pour les discussions rafraîchissantes sur le quai. Merci à Vincent pour ton aide sur la gestion du matériel végétal et plus particulièrement des muscadines, et Vive Adonis !! Merci à Camille et Eric pour vos conseils lors des analyses. Merci à tout le personnel des serres et du domaine pour l'entretien du matériel végétal, base de toute expérimentation, et plus particulièrement à Jacky pour la concrétisation de mes demandes les plus farfelues. Merci à Emilce pour ton encadrement dès mon arrivée en stage et pour ton soutien pendant ces trois années. Enfin, un immense merci à Mona, stagiaire de choc, pour la réalisation d'une grande partie des notations quelles que soit les conditions !

Je tiens aussi à remercier Elizabeth Mitchell pour ses cours d'anglais qui m'ont été très utiles, et Alexandre Péry pour son soutien et sa patience devant mon absence totale, et involontaire, d'assiduité pour les entretiens d'activité !

Je remercie vivement mes ex et futurs ex colocataires de bureau : Sophie pour ton soutien, tes conseils et nos discussions interminables ; Lise pour ton accueil chaleureux, après 6 mois, et ta démonstration que, oui, on peut survivre à une thèse, même quand rien ne marche comme prévu ; Guillaume pour ton calme olympien et ton aide ; Morgane, toujours prête à boire un verre en jouant au molky. Vous êtes certainement les principaux responsables de ma sérénité et de mon absence de stress en cette fin thèse, et c'était pas gagné !

Maud, Marine, Eloïse, les cessions Subway+Ciné sont devenues une véritable institution.

Je suis également très reconnaissante envers la danse et toutes les personnes que j'ai rencontrées grâce à elle qui m'ont permis de décompresser les week-ends. Merci à Audrey, Will, Benoît, Caroline, Anne, Valérie, Dorian, Thierry, Marc, Julien, Olivier, Pablo pour votre présence et votre soutien. Joanne, notre rencontre restera gravée dans ma mémoire, ainsi que toutes nos soirées et sorties délirantes.

Jonathan, Emma, Jacqueline, merci pour votre soutien à distance. Comme quoi, même si les TGV réduisent toujours plus la distance entre Paris et Colmar, il est difficile de se trouver des moments pour se voir.

Enfin, je remercie du fond du cœur mes parents, qui me soutiennent et m'encouragent depuis le début de mes études ; ma maman qui ingurgite des pages et des pages de jargon pour vérifier mon orthographe ; Mamie et tonton Thierry, ces repas de famille riches en débats ; Christiane, ta gentillesse et ton attention ; papi Claude, toujours dans mon cœur. Merci de m'avoir soutenue et supportée tout au long de ces années.

Liste des abréviations

AD	<i>Allelic Depth</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ArMV	<i>Arabidopsis Mosaic Virus</i>
BBCH	<i>Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie</i>
BC	backcross
cv.	<i>cultivar</i>
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
DJ	Degrés Jour
DP	<i>Read Depth</i>
EBN	<i>Endosperm Balance Number</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GBS	<i>Genotyping-By-Sequencing</i>
GC	Chromatographie Gazeuse
GFLV	<i>Grapevine FanLeaf Virus</i>
GIEC	Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat
GLRaV	<i>Grapevine LeafRoll-associated Virus</i>
gsnap	<i>genomic short-read nucleotide alignment program</i>
IFV	Institut Français de la Vigne et du Vin
IFT	Indice de Fréquence des Traitements
Inra	Institut national de la recherche agronomique
LC	Chromatographie Liquide
LOD	Logarithm of odds
MeOH	Méthanol
Mr	<i>Muscadinia rotundifolia</i>
nd	Non détecté
OIV	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
SAM	Sélection Assistée par Marqueurs

SAU	Surface Agricole Utilisée
SDP	Stimulateurs de Défense des Plantes
SDQPV	Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Sp.	Spécificité
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
ssp.	<i>sub-species</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
T _b	Température de base
T _{eff}	Température efficace de croissance
T _{max}	Température maximale journalière
T _{min}	Température minimale journalière
T _{moy}	Température moyenne journalière
TIR-NB-LRR	Toll/Interleukin-1 Receptor - Nucleotide Binding site - Leucine-Rich Repeat domains
TR	Temps de Rétention
UE	Union Européenne
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
u.m.a.	Unité de masse atomique
Vv	<i>Vitis vinifera</i>

Table des matières

Remerciements

Liste des abréviations

Table des matières

Table des illustrations

Chapitre I : Introduction bibliographique	1
1. La vigne, une espèce cultivée	3
a. Taxonomie des Vitacées	3
b. Origines et expansion de <i>V. vinifera</i>	4
<i>i.</i> Une culture originaire du Caucase	4
<i>ii.</i> Un développement autour du bassin méditerranéen	5
<i>iii.</i> Une colonisation mondiale et un enjeu économique majeur	5
c. Biologie de la vigne cultivée	7
<i>i.</i> Cycle de développement de la vigne cultivée	7
<i>ii.</i> Stades phénologiques de la vigne cultivée	9
<i>iii.</i> Morphologie et anatomie de la vigne cultivée	9
d. Maladies de la vigne	11
<i>i.</i> Les virus	11
<i>ii.</i> Les bactéries	11
<i>iii.</i> Les insectes et autres ravageurs	13
<i>iv.</i> Les maladies cryptogamiques et les maladies du bois	13
e. Moyens de lutte contre les maladies et ravageurs	14
<i>i.</i> Les produits phytosanitaires	14
<i>ii.</i> Les stimulateurs de défense des plantes	15
<i>iii.</i> La lutte biologique	15
<i>iv.</i> La création variétale	16
2. La lutte génétique par l'utilisation d'espèces sauvages apparentées	18
a. Intérêt des espèces sauvages apparentées	18
b. Problèmes liés à l'hybridation interspécifique	20
c. Utilisation des espèces apparentées chez d'autres espèces cultivées	22
<i>i.</i> La tomate	22
<i>ii.</i> Le colza	24
<i>iii.</i> Les blés	24
<i>iv.</i> Le riz	25
<i>v.</i> Le tournesol	26
<i>vi.</i> La pomme de terre	27
<i>vii.</i> Le soja	28
<i>viii.</i> Le maïs	29
3. <i>M. rotundifolia</i>, une espèce porteuse de nombreuses résistances aux maladies mais difficile à exploiter dans les programmes d'amélioration de la vigne cultivée	29
a. De multiples résistances	29

b.	Des caractéristiques culturelles et organoleptiques inadaptées à la viticulture européenne	30
i.	Une espèce subtropicale	30
ii.	Une espèce possédant un goût foxé	30
iii.	Autres caractéristiques de <i>M. rotundifolia</i>	33
c.	Des croisements interspécifiques difficiles	34
i.	Un taux de réussite des croisements interspécifiques bas	34
ii.	Une stérilité élevée des hybrides F1	34
iii.	Une fertilité partiellement restaurée dans la descendance	35
4.	Contexte, objectifs et démarche de la thèse	35
a.	Contexte de la création variétale en France : le pyramidage pour la gestion durable des résistances	35
b.	Contexte et objectifs de la thèse	36
c.	Démarche	37
	Chapitre II : Matériel et méthodes	41
1.	Matériel végétal	43
a.	Accessions de <i>V. vinifera</i> et de <i>M. rotundifolia</i>	43
b.	Populations de backcross	43
2.	Méthodes	45
a.	Etude génétique	45
i.	Génotypage-par-séquençage	45
ii.	Cartographie génétique	45
iii.	Chromosome painting	45
b.	Comparaison phénotypique de <i>V. vinifera</i> et <i>M. rotundifolia</i>	47
i.	Phénologie et morphologie	47
ii.	Métabolites secondaires des feuilles et des baies	47
c.	Déterminisme génétique des caractères phénotypiques spécifiques de <i>M. rotundifolia</i>	50
i.	Acquisition des données phénotypiques	50
ii.	Analyse QTL	50
	Chapitre III : Étude de l'évolution des recombinaisons le long du génome et introgression des régions issues de <i>Muscadinia rotundifolia</i>	53
1.	Introduction	55
2.	Introgression reshapes recombination distribution in grapevine interspecific hybrids	56
3.	Conclusion	76
	Chapitre IV : Étude comparative des caractères phénologiques et morphologiques de <i>Vitis vinifera</i> et <i>Muscadinia rotundifolia</i>	77
1.	Introduction	79
2.	Comparative analysis of <i>Vitis vinifera</i> and <i>Muscadinia rotundifolia</i> for traits related to phenology and morphology, and genetic control of <i>M. rotundifolia</i>'s specific traits	80

3. Analyses additionnelles	100
4. Conclusion	101
Chapitre V : Étude comparative des métabolites secondaires de <i>Vitis vinifera</i> et <i>Muscadinia rotundifolia</i>	103
1. Introduction	105
2. Metabolomics analysis of leaves and berries from <i>Vitis vinifera</i> and <i>Muscadinia rotundifolia</i>	106
3. Analyses additionnelles	127
4. Conclusion	130
Chapitre VI : Conclusion générale et perspectives	131
1. Conclusion	133
2. Perspectives	135
a. Perspectives scientifiques	135
<i>i.</i> Comprendre l'impact des régions chromosomiques sur la survie ou la mortalité des hybrides	135
<i>ii.</i> Caractères phénotypiques complexes	136
<i>iii.</i> Recherche des gènes responsables des caractères spécifiques de <i>M. rotundifolia</i>	137
b. Perspectives pour la sélection	137
<i>i.</i> Adaptation la stratégie de sélection	137
<i>ii.</i> Développement de la technique de GBS en sélection	137
Annexes	
Annexe 1 : Données supplémentaires de l'article « Introgression reshapes recombination distribution in grapevine interspecific hybrids »	
Annexe 2 : Données supplémentaires de l'article « Comparative analysis of <i>Vitis vinifera</i> and <i>Muscadinia rotundifolia</i> for traits related to phenology and morphology, and genetic control of <i>M. rotundifolia</i>'s specific traits »	
Bibliographie	

Table des illustrations

Liste des figures

Figure I.1. La famille des Vitacées a. selon la théorie de Planchon (1887), b. selon la théorie de Small (1913)	3
Figure I.2. Diffusion de la vigne cultivée depuis la domestication jusqu'à la fin de l'Antiquité (Lacombe, 2012)	4
Figure I.3. Surface viticole mondiale en 2013 (Aurand, 2014)	6
Figure I.4. Production mondiale de vin en 2013 (d'après FAO)	6
Figure I.5. Cycle biologique annuel de la vigne dans l'hémisphère nord (d'après Reynier, 2007)	7
Figure I.6. Stades phénologiques de la vigne selon les échelles de Baggiolini, Eichhorn et Lorentz et BBCH (IFV, 2009)	8
Figure I.7. Morphologie de la vigne. a. Organisation du rameau principal. b. Face supérieure du limbe de la feuille adulte. c. Face inférieure du limbe de la feuille adulte. d. Grappes de raisin	10
Figure I.8. Symptômes des principales maladies de la vigne	12
Figure I.9. Possibilités de croisements entre différentes accessions d'espèces du genre <i>Lycopersicon</i> (Stevens <i>et al.</i> , 1986)	23
Figure I.10. Triangle de U des Brassicacées (U, 1935)	24
Figure I.11. Stratégie de croisements pour l'introduction de caractères issus d'espèces sauvages apparentées vers <i>S. tuberosum</i> (4x, 4EBN) selon le niveau de ploïdie et l'EBN de l'espèce (Ortiz & Ehlenfeldt, 1992)	28
Figure I.12. Aires de répartition naturelle (en rouge) et de production (en bleu) de <i>M. rotundifolia</i> (d'après Olien, 2001)	31
Figure I.13. Morphologie de la muscadine. a. Organisation du rameau principal. b. Face supérieure du limbe de la feuille adulte. c. Face inférieure du limbe de la feuille adulte. d. Sarment. e. Grappe	32
Figure I.14. Organisation du bourgeon chez <i>M. rotundifolia</i> (d'après Goffinet <i>et al.</i> , 2001)	32
Figure I.15. Démarche générale de la thèse	37
Figure I.16. Principe du GBS (d'après Elshire <i>et al.</i> , 2011)	38
Figure II.1. Principe de l'analyse réalisée pour le chromosome painting	46
Figure II.2. Protocole d'extraction des métabolites volatiles et non volatiles des baies pour les analyses en chromatographies gazeuse et liquide	48
Figure II.3. Protocole d'extraction des métabolites non volatiles des feuilles pour l'analyse en chromatographie liquide	49
Fig 1. Chromosome painting of parental hybrids 1771P and 22-8-78.	59
Fig 2. Transmission rate of <i>M. rotundifolia</i> SNPs in the BC populations.	63
Fig 3. Analysis of recombination rate in homologous vs homeologous regions.	64
Fig 4. Genome-wide analysis of recombination rates.	65
Figure 1: Ranges and distribution observed in <i>V. vinifera</i> , <i>M. rotundifolia</i> and in the populations, of the traits for which QTLs were detected.	86

Figure IV.1. Nombre de feuilles formées sur un rameau en une semaine en fonction de la température moyenne chez <i>V. vinifera</i> et <i>M. rotundifolia</i>	100
Figure IV.2. Évolution de la moyenne de feuilles apparues en une semaine en fonction de la température efficace chez <i>V. vinifera</i> et <i>M. rotundifolia</i>	101
Figure 1: Distributions of the relative abundancy of the ions detected in the BC1 in the vineyard (a) and in the greenhouse (b), in the BC2 (c) and in the BC4 (d). Concentration on x-axis are expressed in log(Normalized area).	115

Liste des tableaux

Tableau I.1. Températures de base et sommes de températures minimales et maximales observées selon les variétés pour les principaux stades phénologiques de la vigne (Duchêne <i>et al.</i> , 2010)	9
Tableau I.2. Niveau de sensibilité relatif de différents cépages aux principaux bioagresseurs (Galet, 2000 ; PI@ntGrape, 2011 ; Reynier, 2007 ; Ephytia, 2014)	19
Tableau I.3. Facteurs de résistance identifiés chez les Vitis	21
Tableau I.4. Exemples d'apports des espèces apparentées à la tomate (Anonyme, 2013 ; Philouze & Laterrot, 1992 ; Stevens <i>et al.</i> , 1986)	23
Tableau I.5. Exemples d'apports des espèces apparentées au colza	24
Tableau I.6. Exemples d'apports des espèces apparentées au blé (Aktar-Uz-Zaman <i>et al.</i> , 2017 ; Li <i>et al.</i> , 2016 ; Nevo & Chen, 2010)	25
Tableau I.7. Exemples d'apports des espèces apparentées au riz	26
Tableau I.8. Exemples d'apports des espèces apparentées au tournesol (Atlagić, 2004 ; Hajjar & Hodgkin, 2007 ; Prasad <i>et al.</i> , 2017)	27
Tableau I.9. Exemples d'apports des espèces apparentées à la pomme de terre (Bradshaw <i>et al.</i> , 2006 ; Bradshaw & Ramsey, 2005 ; Hanneman, 1994 ; Ross, 1979)	28
Tableau I.10. Exemples d'apports des espèces apparentées au maïs	29
Tableau I.11. Principales différences identifiées entre <i>M. rotundifolia</i> et <i>V. vinifera</i> (Bouquet, 1980 ; Olien, 2001 ; Olmo, 1986 ; Patel & Olmo, 1955)	33
Tableau II.1. Organes étudiés sur les accessions de <i>V. vinifera</i> et <i>M. rotundifolia</i> dans les différentes conditions	44
Table 1. Relative length of homeologous regions of 1771P parent and recombination in BC4 population.	59
Table 2. Relative length of homeologous regions of 22-8-78 parent and recombination in BC2 population.	60
Table 3. SNP filtering for genetic mapping.	60
Table 4. Statistics for parental maps of BC1, BC2 and BC4 populations.	61
Table 1: List of accessions of <i>V. vinifera</i> and <i>M. rotundifolia</i> studied for species comparison	82
Table 2: Ranges for specific traits in <i>V. vinifera</i> and <i>M. rotundifolia</i> .	85
Table 3: Characteristics of the factors detected for the traits specific to <i>M. rotundifolia</i>	90
Tableau IV.1. Températures moyennes relevées sur les périodes de mesures	101

Table 1: List of the accessions studied for leaf and berry analyses in the greenhouse (In) and in the vineyard or outside (Out).	109
Table 2: Free and glycosidically bound volatiles in berries specific to <i>M. rotundifolia</i>	113
Table 3: Non-volatile metabolites in leaves specific to <i>M. rotundifolia</i>	114
Table 4: Characteristics of the qualitative and quantitative factors detected for the metabolites specific to <i>M. rotundifolia</i> in leaves	118
Tableau V.1. Métabolites non volatiles des baies spécifiques de <i>M. rotundifolia</i>	127

Chapitre I : Introduction bibliographique

I. Introduction bibliographique

1. La vigne, une espèce cultivée

La vigne cultivée européenne, *Vitis vinifera*, appartient à la famille des Vitacées. Cette espèce a particulièrement gagné en importance depuis sa domestication, dans le Caucase, jusqu'à aujourd'hui. Son expansion autour de la Méditerranée, puis à travers le monde, a suivi le développement des grandes civilisations. Cependant, cette culture est menacée par de nombreux bioagresseurs, notamment depuis la fin du XIX^{ème} siècle, nécessitant la mise en place de moyens de lutte efficaces.

a. Taxonomie des Vitacées

Les vignes sauvages et cultivées appartiennent à la famille des Vitacées. Cette famille comprend 18 ou 19 genres selon les classifications (Galet, 1988 ; Reynier, 2007). En effet, deux opinions s'affrontent au sein des botanistes pour le positionnement du taxon *Muscadinia* dans la famille des Vitacées. La classification communément admise jusque dans les années 1990 est celle de Planchon (1887). Le genre *Vitis* est divisé en deux sous-genres : *Euvinis* Planch. et *Muscadinia* Planch. (Figure I.1a). Cette classification conduit à nommer *Vitis rotundifolia* Michx l'espèce la plus importante du taxon dont le nom commun est muscadine. Une classification alternative a été proposée par Small (1913), considérant *Vitis* et *Muscadinia* comme deux genres distincts (Figure I.1b). Cette classification se fonde sur les différences cytologiques, morphologiques, anatomiques et physiologiques observées entre les deux genres qui se distinguent, notamment, par un nombre chromosomique de base différent, $n = 19$ pour les *Vitis* et $n = 20$ pour les *Muscadinia*. Selon cette dernière classification, le nom d'espèce attribué à la muscadine est *Muscadinia rotundifolia* (Michx) Small.

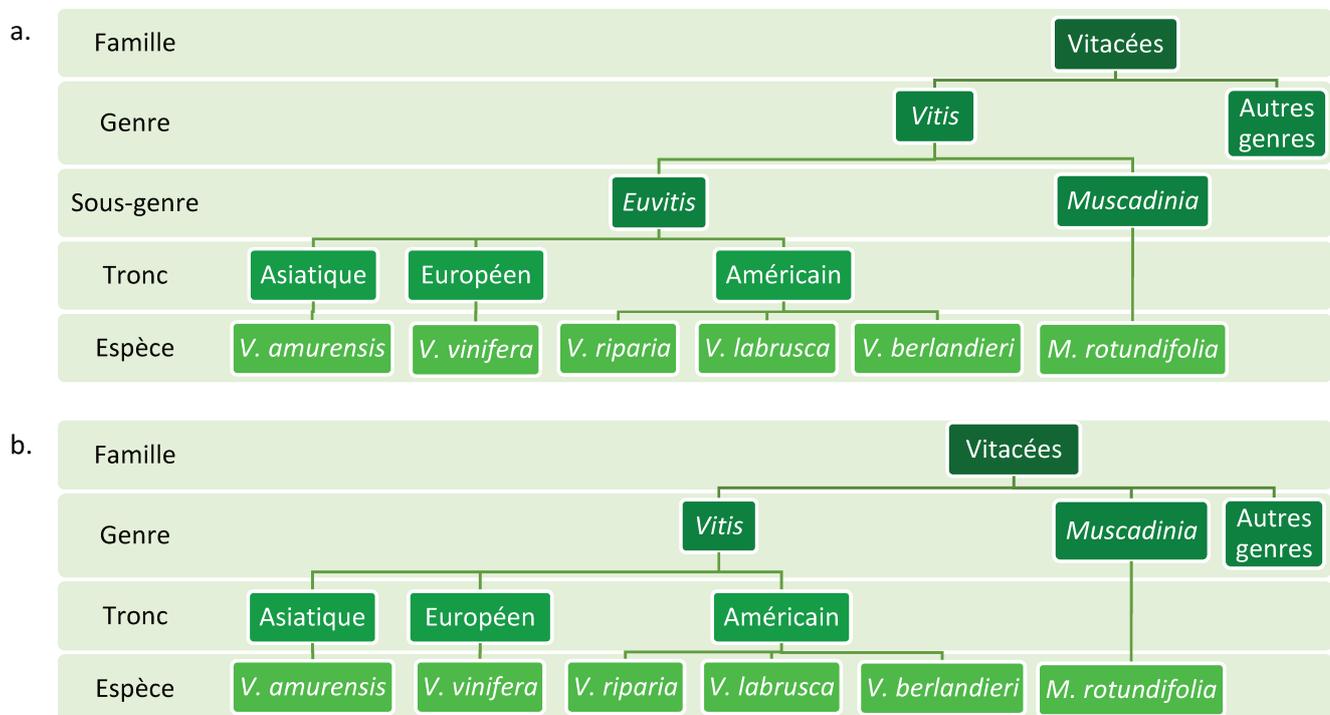


Figure I.1. La famille des Vitacées a. selon la théorie de Planchon (1887), b. selon la théorie de Small (1913)

Le genre *Vitis* comprend environ 60 espèces réparties en trois groupes selon leur origine géographique (Galet, 2000). Le groupe des vignes américaines, originaires d'Amérique du Nord et d'Amérique Centrale, comprend une trentaine d'espèces parmi lesquelles *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. berlandieri*, *V. rupestris*, *V. lincedumii*, *V. aestivalis* et *V. cinerea* qui ont fait l'objet d'une hybridation interspécifique avec la vigne cultivée dans le cadre de programmes d'amélioration génétique. Le groupe des vignes asiatiques comprend également une trentaine d'espèces, dont *V. amurensis* qui a aussi été utilisée dans les programmes d'amélioration génétique. Enfin, l'espèce euro-asiatique, *Vitis vinifera*, est elle-même divisée en deux sous-espèces : *V. vinifera ssp. sylvestris*, la vigne sauvage, et *V. vinifera ssp. sativa*, la vigne cultivée.

Le genre *Muscadinia* ne comprend que 3 espèces : *Muscadinia munsoniana* (Simpson) Small, *Muscadinia popeniae* (Fennell) Small et *Muscadinia rotundifolia* (Michx) Small (Galet, 2000), cette dernière ayant également été hybridée avec la vigne cultivée pour les programmes d'amélioration génétique.

b. Origines et expansion de *V. vinifera*

i. Une culture originaire du Caucase

Les premières traces avérées d'espèces de *Vitis* remontent à 65 millions d'années en Asie (Chine, Japon), en Amérique (Alaska, États-Unis) et en Europe (Champagne). Le climat très doux du miocène (17 à 13 millions d'années environ) favorise la diffusion de nombreuses espèces de vigne dans les régions septentrionales (Islande, Groenland, Alaska, Angleterre). Au début du quaternaire, une série de glaciations détruit en grande partie les vignes ancestrales et les populations de vignes se fragmentent dans différents refuges (Galet, 2000).

La plus grande diversité génétique des vignes au Proche-Orient (Caucase, Croissant fertile) indique une origine de la vigne cultivée dans cette région (Bacilieri *et al.*, 2013 ; Myles *et al.*, 2011). La vigne y aurait été domestiquée il y a 5 à 6 millénaires à partir de populations de *Vitis vinifera ssp. sylvestris* (Myles *et al.*, 2011). Par la suite, la viticulture s'est propagée dans les régions adjacentes puis le long de la Méditerranée via deux voies de diffusion : par les Balkans et l'Europe centrale vers l'Europe de l'ouest, et par le Maghreb vers la péninsule ibérique (Figure I.2) (Bacilieri *et al.*, 2013 ; Lacombe, 2012).

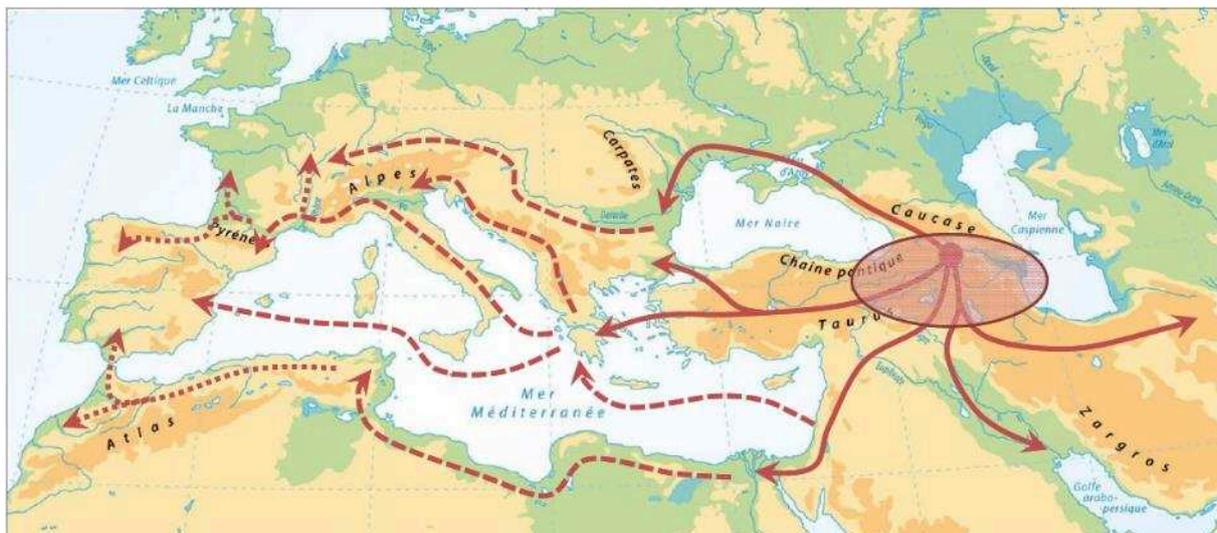


Figure I.2. Diffusion de la vigne cultivée depuis la domestication jusqu'à la fin de l'Antiquité (Lacombe, 2012)

Le centre primaire de domestication est indiqué dans le Caucase. De ce centre, partent des voies de dissémination primaires (flèches en traits pleins), puis des voies de dissémination secondaires durant l'Antiquité (flèches en traits pointillés).

Des gènes de *V. vinifera* ssp. *sylvestris* ont été introduits chez *V. vinifera* ssp. *sativa* lors de sa diffusion par hybridation spontanée, lui permettant de mieux s'adapter au climat et aux pathogènes locaux (Myles *et al.*, 2011). D'autres travaux ont également mis en évidence l'existence de centres de domestication secondaires en Italie et sur la péninsule ibérique (Arroyo-García *et al.*, 2006 ; Grassi *et al.*, 2003).

ii. Un développement autour du bassin méditerranéen

Le développement de la vigne coïncide avec le développement de la civilisation romaine. Les Romains ont permis l'implantation de la vigne vers l'intérieur des terres. Le vin étant considéré comme divin, il a toujours eu un rôle majeur dans le mode de vie des peuples méditerranéens (This *et al.*, 2006). À cette époque, le vin est une boisson raffinée, que l'on boit, lors des repas, coupé d'eau aux deux-tiers et additionné de miel et d'épices. Boire le vin pur est considéré comme une pratique barbare que l'on observe chez les Gaulois notamment (Garrier, 2002 ; Gautier, 1996).

Au Moyen-Âge, l'Église catholique poursuit la dispersion de la vigne dans de nouvelles régions et participe également à des échanges de matériel végétal lors des croisades (This *et al.*, 2006). Le vin a alors deux fonctions principales : l'une honorifique lors des banquets, l'autre médicale. Le vin est en effet fortement recommandé contrairement à l'eau, vecteur d'épidémies (Garrier, 2002).

À la Renaissance, le vin est présent partout en France mais sa consommation régresse face au cidre, en Bretagne et en Normandie, et à la bière, de la Flandre à la Lorraine. Le vignoble français progresse néanmoins grâce à la consommation et à l'exportation de vin, notamment vers l'Angleterre. La France possède la moitié du vignoble mondial en 1828. L'apparition de l'oïdium en 1847, du phylloxéra en 1868 et du mildiou en 1878 impacte fortement la production européenne et réduit la diversité des vignes cultivées et sauvages, alors que la consommation continue d'augmenter (Garrier, 2002 ; This *et al.*, 2006).

À la fin du XIX^{ème} siècle, les modes de production et de consommation ont profondément changé. Le vignoble est entièrement replanté en plants greffés pour faire face aux maladies et ravageurs et l'accent est mis sur la qualité plutôt que sur la quantité. L'étude des assemblages de cépages selon le terroir permet de définir de nouveaux encépagements qui seront définitivement ancrés dans les modes de production avec les premières appellations d'origine contrôlée en 1935. Le vin n'est plus considéré comme un aliment mais devient une boisson plaisir. Il est bu pour ses qualités intrinsèques et son goût n'est plus masqué par des épices et de l'eau (Garrier, 2002).

iii. Une colonisation mondiale et un enjeu économique majeur

Pendant la Renaissance, la vigne cultivée européenne a été exportée jusqu'en Amérique ; puis, au XIX^{ème} siècle, en Afrique du Sud, Australie et Nouvelle-Zélande (This *et al.*, 2006). La culture de la vigne est aujourd'hui présente sur tous les continents (Figure I.3). L'Europe reste cependant le principal producteur de vin avec 62 % de la production mondiale en 2014, la France (46,5 MhL), l'Italie (44,2 MhL) et l'Espagne (39,5 MhL) étant les trois principaux producteurs (Figure I.4) (Anonyme, 2017). Amorcée pendant la seconde moitié du XX^{ème} siècle, la chute de la consommation de vin dans les pays traditionnellement producteurs, s'est fortement ralentie ces dernières années. Les États-Unis sont les premiers consommateurs de vin en 2014 avec 30,4 MhL, suivis par la France (27,5 MhL) et l'Allemagne (20,2 MhL) (Anonyme, 2017).

En 2014, avec 789 247 ha, la viticulture représente 2,7 % de la surface agricole utilisée (SAU) française (d'après Agreste, Statistique agricole annuelle). L'incitation à l'arrachage des vignes à vin de consommation courante a fortement fait diminuer les surfaces de vigne au cours des années 1980. Ces mesures avaient pour but de limiter les excédents tout en favorisant la qualité. La production de vin courant a ainsi fortement régressé au profit du vin sous appellations (d'après Agreste, Statistique agricole annuelle). De ce fait, bien qu'elle ne soit que le 3^{ème} producteur mondial en volume, la France est le premier producteur mondial de vin en valeur (d'après FranceAgriMer). Le tiers de la production



Figure I.3. Surface viticole mondiale en 2013 (Aurand, 2014)

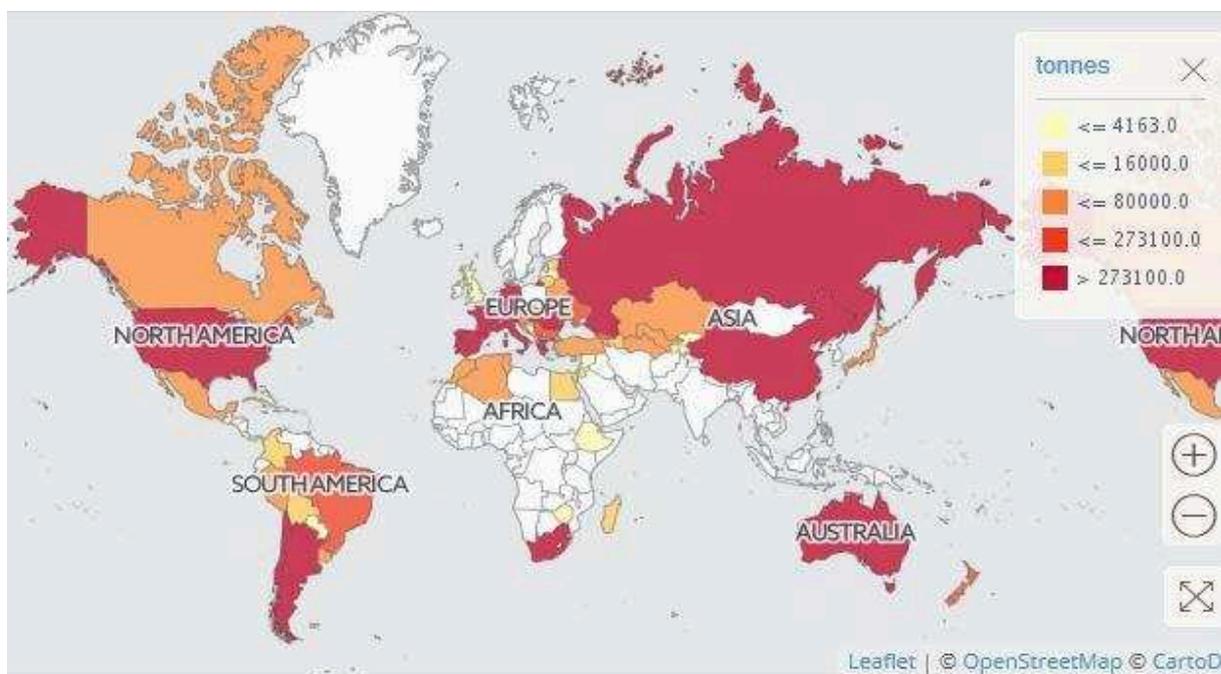


Figure I.4. Production mondiale de vin en 2013 (d'après FAO)

française est exporté chaque année vers l'Allemagne, le Royaume-Uni, la Belgique, la Chine, les États-Unis et le Japon, pour une valeur de près de 8 G€ (d'après Agreste). La viticulture est le 2^{ème} secteur exportateur national derrière l'aéronautique et le 1^{er} pour les produits agricoles (d'après FranceAgriMer). La production de vin a donc un poids conséquent dans le secteur agricole puisqu'elle représente 15 % de la valeur de la production agricole française (d'après FranceAgriMer).

c. Biologie de la vigne cultivée

i. Cycle de développement de la vigne cultivée

En climat tempéré, le cycle de développement de la vigne est marqué par un cycle végétatif et un cycle reproducteur se déroulant en simultané, suivis d'un repos hivernal (Figure I.5).

Le cycle végétatif correspond au développement du système végétatif de la vigne. Son commencement est annoncé par les pleurs, des gouttes de sèves émises au niveau des plaies de taille, correspondant à la reprise de l'activité racinaire (Reynier, 2007). Le débourrement signale le début du cycle végétatif avec le développement et la croissance des rameaux à partir des bourgeons dormants. Ce cycle est ensuite marqué par deux phases : la croissance des organes végétatifs et l'aoûtement. Fin juillet-début août, la croissance s'arrête. Les produits élaborés dans les feuilles sont progressivement accumulés dans le bois qui brunit. La fin du cycle végétatif est marquée par la chute des feuilles.

Le cycle reproducteur correspond au développement des organes reproducteurs aboutissant à la formation de graines. Quelques jours après le débourrement, les ébauches d'inflorescences, formées l'année précédente, sortent des bourgeons. Les inflorescences croissent jusqu'à la floraison à la fin du printemps. Après la fécondation, la croissance de la baie se déroule en plusieurs phases (Carbonneau *et al.*, 2007). La croissance herbacée, ou stade vert, dure environ 40 jours à partir de la nouaison, stade de formation du fruit suite à la fécondation. La baie grossit rapidement jusqu'à la véraison. À partir de la véraison, le fruit se ramollit suite à l'entrée de sucres et d'eau dans la baie. Les anthocyanes responsables de la coloration de la baie sont synthétisés et les stomates sont obturées par de la cire. Il s'agit de la phase de maturation. La phase de surmaturation débute 120 jours après floraison. Les flux s'arrêtent, le volume de la baie reste stable voire diminue provoquant son flétrissement.

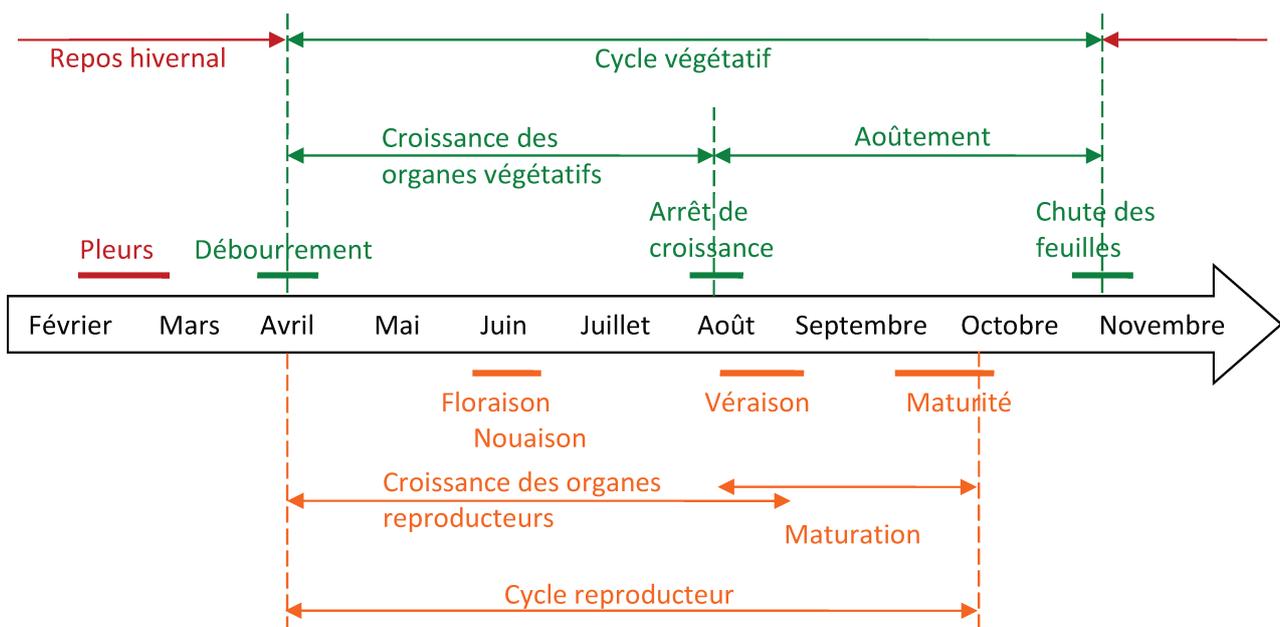
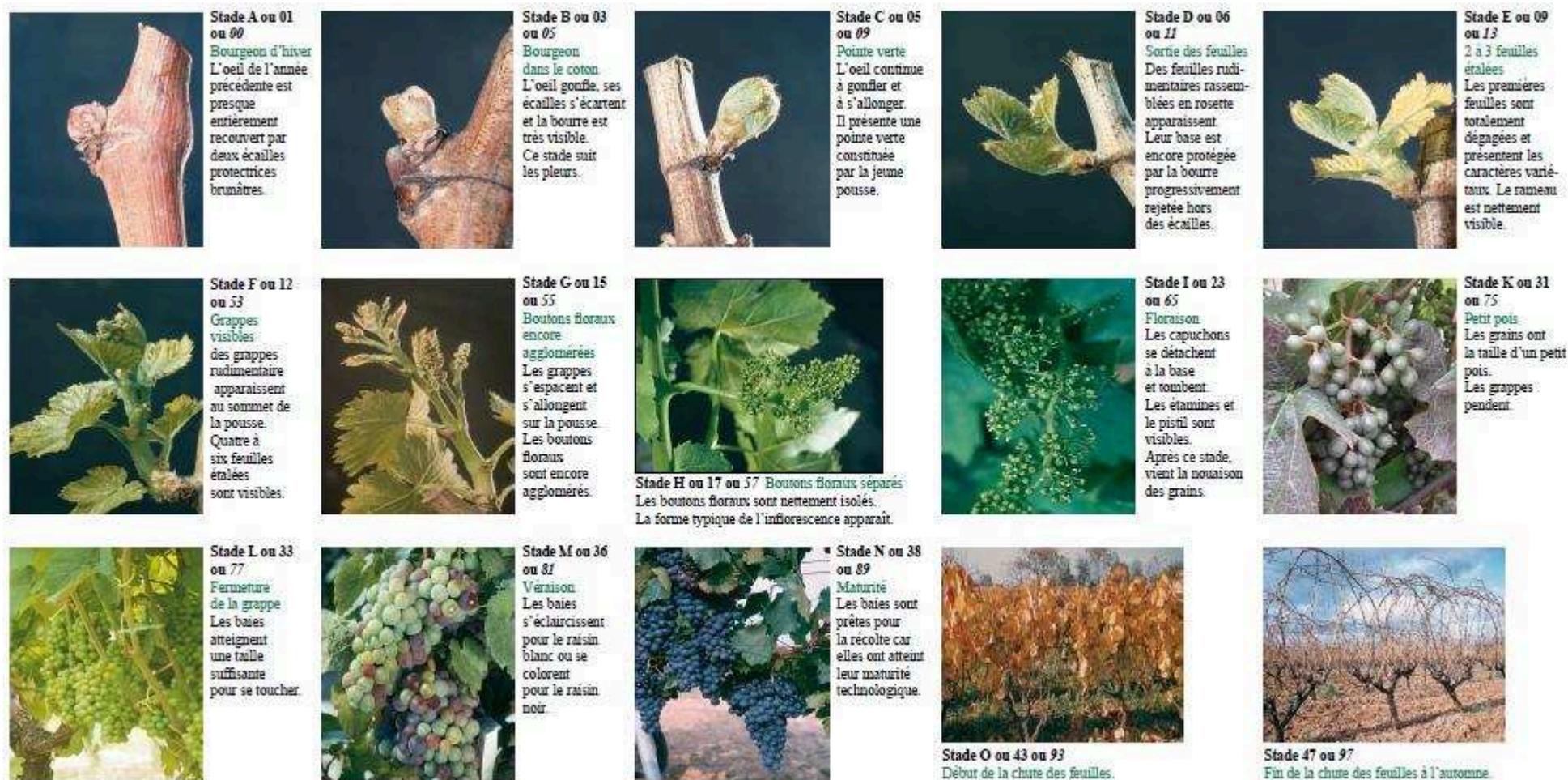


Figure I.5. Cycle biologique annuel de la vigne dans l'hémisphère nord (d'après Reynier, 2007)



Depuis 1994, la notation des stades phénologiques de la vigne s'effectue suivant une échelle numérique s'étalant de 1 à 47, établie par Eichhorn & Lorenz. Cette échelle complète celle de Baggioini, notée de A à O, surtout au niveau de la floraison. Enfin, il existe une échelle universelle pour toutes les monocotylédones et les dicotylédones, appelée BBCH (Biologische Bundesanstalt bundessortenamt and CHEMical industry). Chaque stade est défini par une lettre et deux chiffres dans l'ordre : Baggioini, Eichhorn & Lorenz et BBCH.

Figure 1.6. Stades phénologiques de la vigne selon les échelles de Baggioini, Eichhorn et Lorenz et BBCH (IFV, 2009)

ii. Stades phénologiques de la vigne cultivée

Le suivi du développement de la vigne est souvent effectué avec les échelles de Baggiolini ou avec l'échelle BBCH (Figure I.6). Comme pour la grande majorité des plantes, le développement de la vigne est dépendant de la température. Il existe une corrélation positive entre la vitesse de développement et de croissance de la vigne et la température. Pour caractériser chaque stade phénologique, il est courant d'appliquer la méthode des sommes de températures. Cette méthode considère qu'au-delà d'une température seuil, appelée zéro de végétation ou température de base (T_b), le développement d'une plante est proportionnel à la température du milieu dans lequel pousse la plante. Pour chaque jour, il est donc possible de calculer une température efficace (T_{eff}) de croissance à partir de la température de base (T_b) et de la température moyenne du jour (T_{moy}) :

- si $T_{moy} < T_b$, alors $T_{eff} = 0$,
- si $T_{moy} > T_b$, alors $T_{eff} = T_{moy} - T_b$.

T_{eff} est exprimée en Degrés Jour (DJ). Sur une période donnée, les T_{eff} s'accumulent. La somme des T_{eff} est supposée stable entre deux stades phénologiques donnés, quel que soit le milieu ou l'année. En revanche, d'une espèce ou d'une variété à l'autre, cette valeur varie.

La température de base communément utilisée pour la vigne est 10°C. Cependant, une étude réalisée par Duchêne *et al.* (2010) a montré que la température de base variait tout au long du cycle de développement de la vigne (Tableau I.1). De même, les sommes de températures calculées varient en fonction de la période étudiée.

Tableau I.1. Températures de base et sommes de températures minimales et maximales observées selon les variétés pour les principaux stades phénologiques de la vigne (Duchêne *et al.*, 2010)

Période	Température de base (°C)	Somme de température minimale observée (DJ)	Somme de température maximale observée (DJ)
15 février – Débourrement	-2	597	799
Débourrement – Floraison	7	587	676
Floraison – Véraison	3	1043	1388

iii. Morphologie et anatomie de la vigne cultivée

La vigne étant une liane, sur le rameau, chaque feuille est opposée à une vrille qui lui permet de s'accrocher à un support selon le rythme défini (1 vrille / 1 vrille / Ø) (Figure I.7a). Les feuilles de *V. vinifera* (Figure I.7b) ont une forme très variable selon les variétés de vigne cultivée. Cette grande variabilité est l'une des principales caractéristiques utilisées par les ampélographes pour la reconnaissance des variétés. Les sinus latéraux plus ou moins profonds donnent des feuilles généralement quinquelobées. Cependant, selon les variétés, les feuilles peuvent être entières ou avoir jusqu'à plus de 7 lobes (Anonyme, 2009). Le sinus pétiolaire est généralement fermé à très chevauchant. La pilosité de la feuille est très variable avec la face inférieure du limbe glabre à cotonneuse (Figure I.7c) (Galet, 1988).

Les fleurs de la vigne sont regroupées en inflorescences dont les ramifications et le nombre de fleurs dépendent de la variété et de la position de l'inflorescence sur le rameau. La formule florale de la vigne est (5S) + (5P) + (5E) + (2C) + nectaire (Reynier, 2007). Le raisin est une baie charnue dont les caractéristiques telles que la forme, la couleur de la peau ou les arômes varient de façon importante selon les variétés, en particulier entre les variétés de cuve et les variétés de table (Figure I.7d). La baie admet toute une palette de couleurs allant du vert au bleu noir, en passant par le jaune, le rose ou le rouge, et de forme aplatie à cylindrique, voire arquée (Anonyme, 2009). Son jus est sucré et acidulé, et peut présenter une variété de profils aromatiques, par exemple herbacé ou muscaté (Anonyme, 2009).

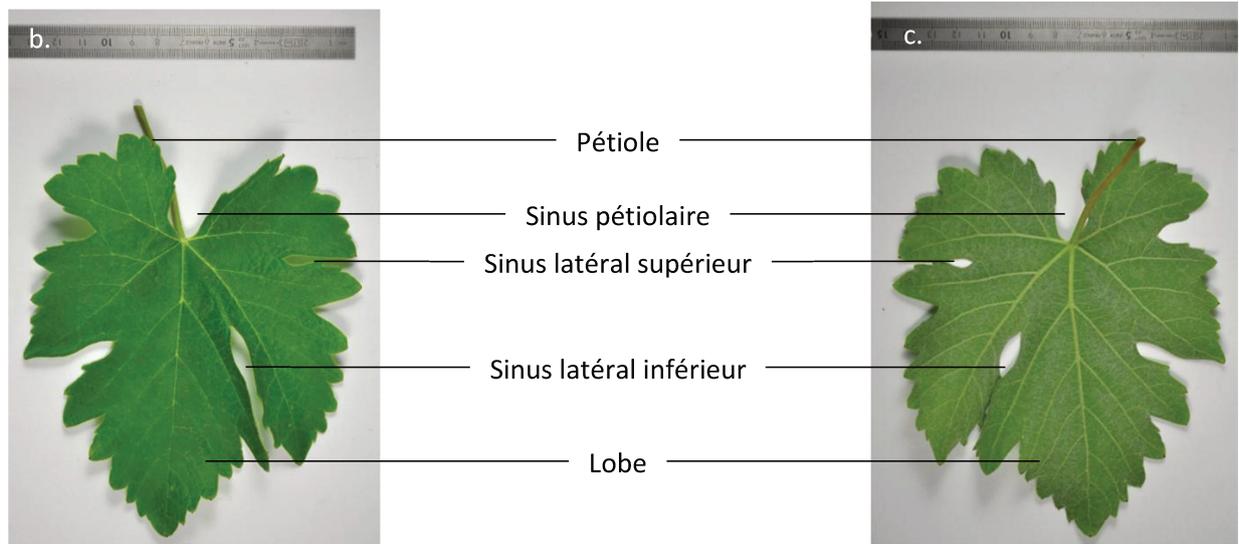
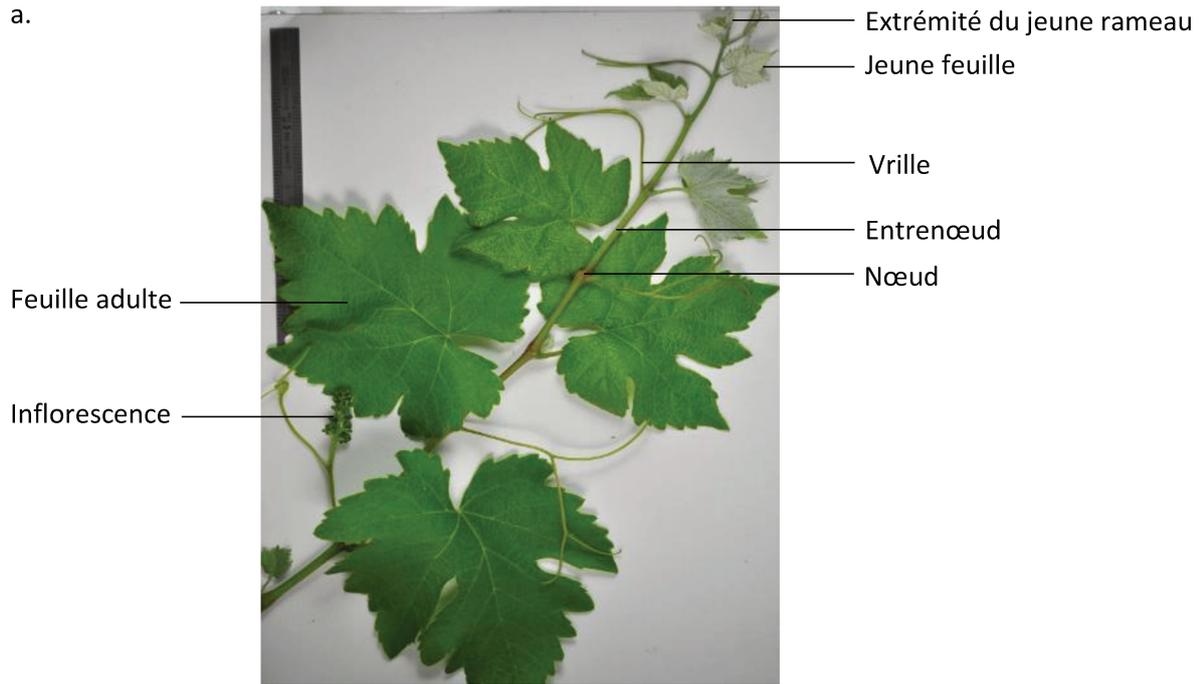


Figure I.7. Morphologie de la vigne. a. Organisation du rameau principal. b. Face supérieure du limbe de la feuille adulte. c. Face inférieure du limbe de la feuille adulte. d. Grappes de raisin

d. Maladies de la vigne

La vigne est la cible de nombreux bioagresseurs. L'arrivée, au XIX^{ème} siècle, de pathogènes tels que le mildiou, l'oïdium, le black-rot ou le phylloxéra a profondément changé le paysage viticole en rendant la viticulture fortement dépendante de l'utilisation des produits phytosanitaires.

i. Les virus

Une soixantaine de virus ont été identifiés comme infectant les vignes (Martelli, 2014). Certains d'entre eux sont à l'origine de graves maladies impactant fortement la viabilité de la plante et la qualité des produits viticoles. Les deux principales maladies virales sont l'enroulement et le court-noué. Elles touchent tous les organes de la plante et provoquent d'importants dégâts. Ces deux maladies sont connues depuis le milieu du XIX^{ème} siècle et sont aujourd'hui présentes dans la plupart des vignobles du monde (Martelli, 2014).

La maladie de l'enroulement est causée par cinq virus appelés *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) -1 à -4 et -7 (Martelli, 2014). Cette maladie est surtout caractérisée par un épaississement du limbe des feuilles dont les bords s'enroulent vers le bas (Figure 1.8a). Chez les cépages rouges, le limbe des feuilles rougit alors que chez les cépages blancs, il jaunit. Les baies sont petites, pauvres en sucre et mûrissent tard (Galet, 2000). La qualité de la récolte est ainsi fortement impactée sans pour autant mettre en péril la vie de la plante infectée. L'enroulement de la vigne s'est propagé dans le monde entier par échange de matériel végétal infecté ou porteur de l'insecte vecteur, une cochenille (Martelli, 2014). En outre, la progression de cette maladie sur une parcelle infectée est rapide. En huit ans, le taux d'infestation peut passer de 5 % à 86 % (Le Maguet *et al.*, 2013).

La maladie du court-noué, *fanleaf degeneration* en anglais, est causée par deux principaux virus : le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), transmis par le nématode *Xiphinema index*, et l'*Arabis mosaic virus* (ArMV), transmis par le nématode *X. diversicaudatum* (Martelli, 2014). Le court-noué est caractérisé par des entrenœuds raccourcis, des rameaux aplatis et en zig-zag (Figure 1.8b). Les feuilles prennent un faciès en forme d'éventail, d'où le nom anglais, en raison de la diminution des angles entre les nervures. Cette maladie provoque une forte coulure, chute des fleurs, et un millerandage, défaut de développement de certaines baies de la grappe suite à une fécondation imparfaite, impactant sévèrement la récolte (Galet, 2000). Les pieds infectés dépérissent progressivement. Comme l'enroulement, le court-noué s'est propagé à travers le monde par l'échange de matériel végétal infecté ou par transport de sol contaminé par des nématodes vecteurs (Martelli, 2014). Du fait de son vecteur tellurique, le court-noué a une expansion lente au vignoble. Les pieds se contaminent de proche en proche.

ii. Les bactéries

Les bactéries sont à l'origine de deux maladies majeures : la flavescence dorée et la maladie de Pierce. Ces deux maladies provoquent, en quelques années, la mort des pieds de vigne infectés et sont un problème majeur dans les vignobles contaminés en raison de l'absence de traitement curatif.

La flavescence dorée est une maladie causée par un phytoplasme, une bactérie sans paroi, résidant dans le phloème (ephytia.inra.fr). Cette bactérie cause sur la vigne infectée des symptômes qui peuvent se manifester une à plusieurs années suivant l'infection. Le limbe des feuilles est enroulé vers le bas et cassant. À l'automne, le limbe rougit sur les cépages rouges et jaunit sur les cépages blancs. Les inflorescences et les grappes se dessèchent, provoquant une forte chute du rendement (Figure 1.8c) (Galet, 2000). Le symptôme caractéristique est l'absence d'aoûtement des rameaux qui restent flexibles et prennent un port retombant (ephytia.inra.fr). L'absence d'aoûtement correct chez la plante fragilise fortement le pied. La flavescence dorée n'est observée que depuis une cinquantaine d'années en Europe suite à l'introduction de son vecteur, la cicadelle *Scaphoideus titanus*, originaire d'Amérique du Nord (Papura *et al.*, 2012). Cette cicadelle vectrice vit uniquement sur les *Vitis* et

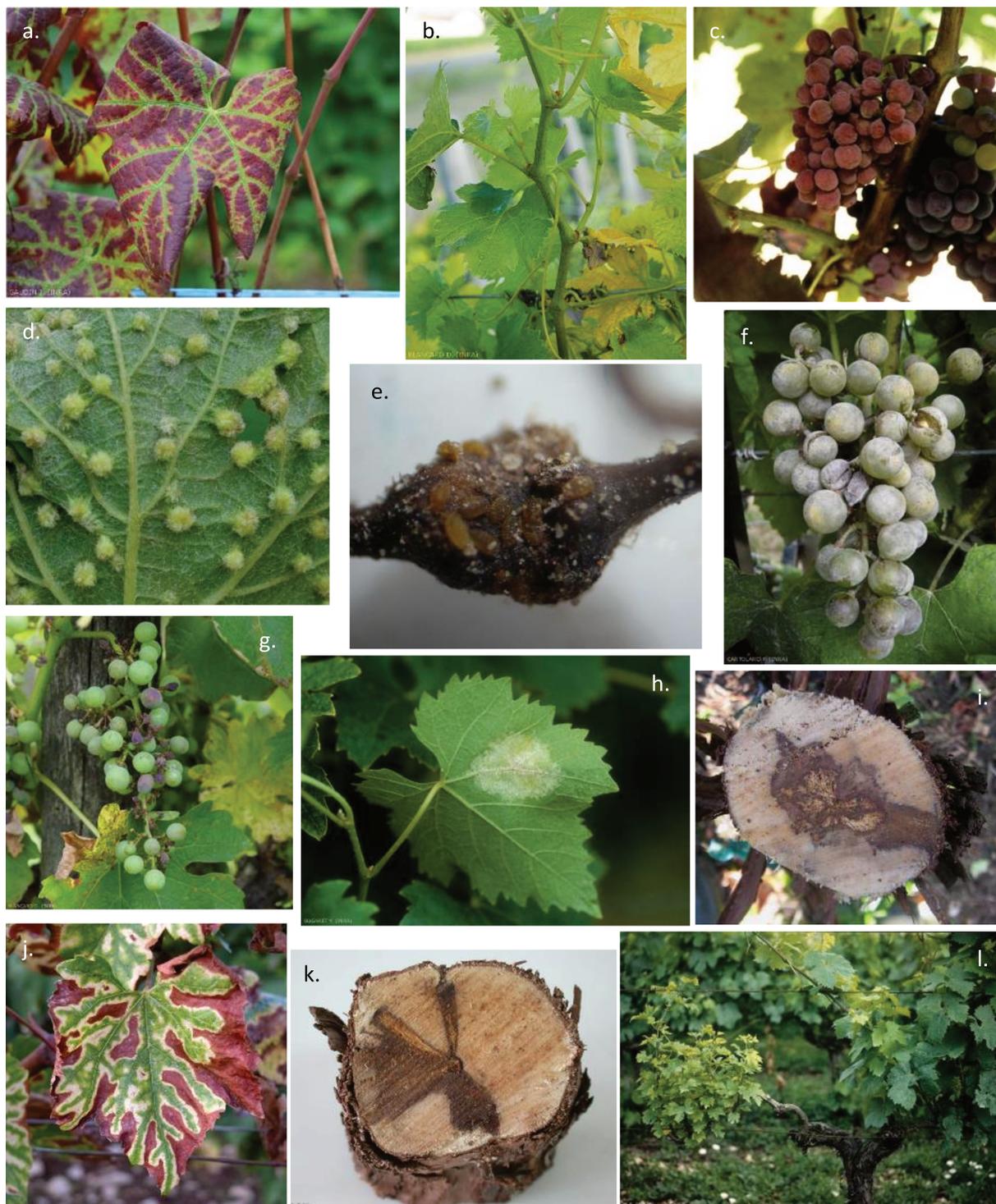


Figure 1.8. Symptômes des principales maladies de la vigne

a. Enroulement, feuille enroulée rougie d'un cépage rouge. Photographie : J. Gaudin, Inra (ephytia.inra.fr). b. Court-noué, rameau en zig-zag. Photographie : D. Blancard, Inra (ephytia.inra.fr). c. Flavescence dorée, grappe desséchée. Photographie : D. Blancard, Inra (ephytia.inra.fr). d. Phylloxéra, galls sur la face inférieure du limbe. Photographie : ephytia.inra.fr. e. Larves de *Daktulosphaira vitifoliae* sur une nodosité. Photographie : ephytia.inra.fr. f. Oidium, baies éclatées sur une grappe infectée. Photographie : P. Cartolaro, Inra (ephytia.fr). g. Mildiou, rot brun sur grappe. Photographie : D. Blancard, Inra (ephytia.inra.fr). h. Mildiou, feuille infectée. Photographie : Y. Bugaret, Inra (ephytia.inra.fr). i. Esca, lésions nécrotiques du bois. Photographie : P. Lecomte, Inra (ephytia.inra.fr). j. Esca, feuille décolorée. Photographie : D. Blancard, Inra (ephytia.inra.fr). k. Eutypiose, nécrose sectorielle sur bois. Photographie : P. Lecomte, Inra (ephytia.inra.fr). l. Eutypiose, rameau rabougri. Photographie : P. Lecomte, Inra (ephytia.inra.fr).

l'expansion de la maladie sur une parcelle infectée peut-être très rapide. Pour cette raison, en plus du fait que la maladie est incurable, la flavescence dorée est une maladie de quarantaine en Europe (Directive Européenne 2000/29/CE).

La maladie de Pierce est très répandue en Amérique où elle provoque d'importants dégâts, notamment dans le vignoble californien. Cette maladie est causée par la bactérie *Xylella fastidiosa*. La bactérie colonise essentiellement les vaisseaux conducteurs tels que le xylème et les obstrue provoquant le dessèchement et la chute des feuilles ainsi qu'un aoûtement partiel des rameaux (ephytia.inra.fr). Un pied infecté meurt en quelques années. Les principaux vecteurs sont les cicadelles et les cercopes (ephytia.inra.fr). Mais, tout insecte se nourrissant directement dans le xylème peut inoculer la maladie. *X. fastidiosa* possède une gamme d'hôtes très étendue avec plus de 300 espèces de plantes, dont la vigne, les agrumes, l'olivier, les *Prunus*, le chêne ou la luzerne (EFSA, 2016). L'étendue de la gamme d'hôtes, notamment parmi des espèces d'intérêt économique, ainsi que la multiplicité de ses vecteurs font de *X. fastidiosa* un pathogène particulièrement préoccupant car, comme la flavescence dorée, la maladie de Pierce est incurable.

iii. Les insectes et autres ravageurs

Le ravageur le plus tristement connu sur vigne est le phylloxéra, *Daktulosphaira vitifoliae*. Ce puceron originaire d'Amérique du Nord a été identifié pour la première fois dans le sud de la France par Planchon en 1868. L'arrivée du phylloxéra a provoqué une forte chute de la production viticole, passant de 85 MhL en 1875 à moins de 30 MhL en 1879 (Garrier, 2002), et la disparition de nombreux cépages. Son introduction en Europe provient de l'importation de matériel végétal depuis les États-Unis. Les piqûres de l'insecte engendrent des galles sur la face inférieure des feuilles, des nodosités sur les racinelles et des tubérosités sur les racines plus âgées (Figure I.8d et Figure I.8e). Des fissures au niveau des tubérosités permettent l'entrée de microorganismes du sol dans la plante et provoquent la mort de la plante en quelques années (ephytia.inra.fr). Le phylloxéra possède un cycle biologique complexe qui varie en fonction de l'espèce parasitée. Sur les espèces américaines, *D. vitifoliae* aura une phase aérienne suivie d'une phase racinaire. Sur *V. vinifera*, la phase racinaire est principalement observée.

D'autres ravageurs sont présents sur la vigne. Les papillons cochylis, eudémis, eulia et pyrale sont communément connus sous le nom de vers de la grappe. Ils provoquent de gros dommages en s'installant dans les inflorescences et dans les baies (Galet, 2000). Enfin, les nématodes, les cicadelles et les cochenilles, en plus d'engendrer des dégâts au niveau des feuilles et des racines sont vecteurs de maladies virales ou bactériennes (Galet, 2000).

iv. Les maladies cryptogamiques et les maladies du bois

Les maladies cryptogamiques touchent les organes herbacés des plantes et sont causées par des champignons ou d'autres organismes filamenteux. Quand ces maladies touchent les parties lignifiées de la plante, on parle de maladies du bois.

Parmi les maladies cryptogamiques les plus connues, on trouve l'oïdium, causé par l'ascomycète *Erysiphe necator*, le mildiou, causé par l'oomycète *Plasmopara viticola*, et également le black-rot, causé par l'ascomycète *Guignardia bidwellii*. Ces pathogènes ont été importés du continent nord-américain par l'introduction de matériel végétal infecté. L'oïdium a fait son apparition en France en région parisienne en 1848. C'est le premier pathogène étranger rapporté. Le mildiou est arrivé en 1878 (Reynier, 2007). L'oïdium, *powdery mildew* en anglais, se développe à la surface des organes verts de la vigne provoquant l'apparition d'un feutrage gris sur le limbe des feuilles, sur les rameaux, sur les inflorescences et les jeunes baies. L'action d'*E. necator* ralentit le développement des baies qui murissent mal, voire éclatent en cas d'infection importante (Figure I.8f). L'éclatement des baies permet l'entrée d'autres pathogènes tels que *Botrytis cinerea*, responsable de la pourriture grise (ephytia.inra.fr). L'oïdium passe l'hiver sous forme de mycélium dans les bourgeons ou grâce à des

cléistothèces, des structures issues de la reproduction sexuée se fixant principalement sur l'écorce des sarments. Le mildiou, *downy mildew* en anglais, se développe sur la face inférieure des feuilles et pénètre par les stomates. Il est à l'origine d'un faciès « tache d'huiles » sur le limbe et ses fructifications forment un duvet blanc sur la face inférieure du limbe. Les baies sont sensibles aux attaques de mildiou jusqu'à la véraison. Un duvet blanc se développe à leur surface, on parle de rot gris, puis les baies brunissent et se dessèchent, on parle de rot brun (Figure I.8g et Figure I.8h) (ephytia.inra.fr). Une attaque sévère de mildiou peut entraîner une défoliation totale du pied qui se trouve fragilisé.

Les maladies du bois sont des maladies anciennes, en recrudescence depuis la fin du XX^{ème} siècle. Il existe trois principales maladies du bois, l'esca, l'eutypiose et le dépérissement à *Botryosphaeria*, ou *black dead arm*. Ces maladies sont préoccupantes car elles peuvent provoquer la mort soudaine du pied et aucun traitement n'est aujourd'hui envisageable. D'autre part, peu d'informations sont disponibles sur les agents responsables de ces maladies. L'esca est une maladie due à des champignons lignivores. Cependant, il pourrait s'agir d'un ensemble plus complexe, constitué de champignons et de bactéries (Bruez *et al.*, 2015). Bien que l'esca colonise le bois de la vigne, des symptômes foliaires liés à des désordres vasculaires peuvent apparaître. En particulier, la décoloration des feuilles accompagnée de lésions nécrotiques donnent un aspect tigré caractéristique aux feuilles (Figure I.8i et Figure I.8j). Sous sa forme foudroyante, ou apoplectique, l'esca provoque le flétrissement et le dessèchement du feuillage, aboutissant à la mort soudaine du pied. Ce phénomène se produit souvent en été après une période pluvieuse suivie d'une forte chaleur (ephytia.inra.fr). La pénétration des pathogènes dans la plante se fait par des plaies de taille lors de périodes douces et pluvieuses (ephytia.inra.fr). L'incidence de l'esca est très importante, notamment en France où jusqu'à 83 % des parcelles présentaient des symptômes sur un suivi réalisé entre 2003 et 2008 (Doublet *et al.*, 2014). Le dépérissement à *Botryosphaeria* est très peu connu, les premières études remontant aux années 1970. Actuellement, 21 espèces de champignons appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été identifiées comme agents pathogènes responsables du dépérissement (ephytia.inra.fr). Ces champignons sont polyphages et engendrent des symptômes à la fois sur le bois et les parties herbacées (ephytia.inra.fr). L'eutypiose, causée par le champignon *Eutypa lata*, s'est fortement développée à partir des années 1970. Jusqu'à 52 % des parcelles présentaient des symptômes sur un suivi réalisé entre 2003 et 2008 (Doublet *et al.*, 2014). Cette maladie se caractérise par un rabougrissement des rameaux qui finissent par mourir en 3 à 5 ans suite à des nécroses sectorielles du bois (Figure I.8k et Figure I.8l) (Galet, 2000). L'impact sur le rendement se manifeste par des inflorescences qui dessèchent et des symptômes de coulure et de millerandage (ephytia.inra.fr).

e. Moyens de lutte contre les maladies et ravageurs

i. Les produits phytosanitaires

Aujourd'hui, la lutte contre les maladies et ravageurs viticoles est essentiellement fondée sur l'utilisation de produits phytosanitaires. En France, l'Indice de Fréquence des Traitements (IFT) en viticulture est en moyenne de 13, hissant cette culture au deuxième rang des cultures les plus consommatrices en pesticides (14,4 %) derrière les grandes cultures (67,4 %), pour une superficie nettement inférieure, respectivement 3,3 % et 45,7 % de la SAU française (Butault *et al.*, 2011).

En 2010, les parcelles traitées ont reçu en moyenne 12 traitements fongicides, 2 traitements herbicides et 2 traitements insecticides (d'après Agreste, Enquête sur les pratiques culturales en viticulture en 2010). Les traitements fongicides permettent principalement de contrôler les infections de mildiou et d'oïdium mais également d'autres pathogènes fongiques. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement phytosanitaire pour les virus, les bactéries et les maladies du bois. La lutte contre ces maladies, quand elle existe, repose sur la gestion des populations de vecteurs, via des traitements insecticides. Ainsi, la lutte contre la flavescence dorée repose uniquement sur des traitements

insecticides dans le but d'éliminer les populations de cicadelles. Ces traitements sont obligatoires en zones contaminées ce qui représente près de la moitié du vignoble (Quéré & Sermier, 2015).

Cependant, les produits phytosanitaires montrent certaines limites. Des résistances à ces produits apparues chez des bioagresseurs, notamment le mildiou et l'oïdium, rendent leur utilisation inefficace (Colcol & Baudoin, 2016 ; Gisi & Sierotzki, 2008). En outre, certains produits phytosanitaires sont nocifs pour l'homme et l'environnement. Ainsi, la désinfection des sols par l'aldicarbe ou le dichloropropène, pour lutter contre les nématodes vecteurs du virus du court-noué, a été interdite pour des raisons environnementales (Journal officiel de l'UE, L76 :21-23, 2003 et L249 :11-13, 2007). De même, l'esca et le dépérissement à *Botryosphaeria* ont longtemps été maîtrisées par l'utilisation d'arsénite de sodium, interdit depuis 2001 en raison de sa dangerosité pour la santé des utilisateurs (Note de service DGAL/SDQPV n° 2001-8160).

ii. Les stimulateurs de défense des plantes

Les stimulateurs de défense des plantes (SDP) sont des molécules capables d'être reconnues par la plante et de déclencher les événements moléculaires, biochimiques et cytologiques menant à l'expression de la résistance (Benhamou & Rey, 2012). Il existe deux types de SDP, les éliciteurs et les potentialisateurs. Les éliciteurs sont des molécules capables de mimer l'effet d'un agent pathogène, ayant pour effet de déclencher les mécanismes de défense des plantes en l'absence de l'agresseur. Les potentialisateurs sont des molécules qui ne déclenchent que les premières étapes de la résistance induite, ayant pour effet de préparer la plante à répondre plus rapidement et plus efficacement à l'attaque (Benhamou & Rey, 2012).

Les SDP sont des substances d'origine biologique *a priori* non dangereuses pour la santé humaine et l'environnement. Leur faible dose d'application et leur biodégradabilité réduisent les risques de résidus dans les sols. D'autre part, leur mode d'action cible la plante et non l'agent pathogène en induisant la mise en place de mécanismes de défense nombreux et variés par la plante. Le risque de contournement par le pathogène est donc réduit (Benhamou & Rey, 2012).

Cependant, à l'heure actuelle, les SDP ont fait l'objet de peu d'études ayant abouties et nous n'avons que très peu de connaissances sur les doses à utiliser et les périodes d'application. Le mode d'action des SDP et leur impact sur la plante, notamment en termes de coût énergétique, sont peu connus. De plus, leur efficacité varie beaucoup en fonction des conditions. Parmi les nombreux tests réalisés jugeant de l'efficacité des SDP, les résultats sont très variables. Enfin, il est possible que les SDP aient un effet allergène en raison de l'utilisation de mélanges de molécules inconnus et de la stimulation de la synthèse de nouvelles molécules par les plantes (Andersen *et al.*, 2011 ; Komatsu *et al.*, 2006).

Néanmoins, plusieurs composés ont été mis en évidence comme ayant un effet sur la vigne. Par exemple, selon Aziz *et al.* (2003), le Lodus 40®, un SDP ayant pour principe actif la laminarine extraite de l'algue brune (*Laminaria digitata*), permet une réduction *in vitro* de l'infection par *P. viticola* et par *B. cinerea* respectivement de 75 % et 55 %. De même, selon Gindro *et al.* (2007), la racine de rhubarbe et l'écorce de bourdaine permettent d'éliciter les mécanismes de défense de la vigne et d'inhiber le développement du mildiou de façon significative. Cependant, leur utilisation au vignoble reste limitée du fait de leur efficacité aléatoire.

iii. La lutte biologique

Le développement de l'agriculture biologique en viticulture a suivi celui des autres cultures afin de produire des vins plus respectueux de l'environnement et de la santé des viticulteurs et des consommateurs. Ainsi, en 2010, 6 % des surfaces viticoles sont cultivées selon le cahier des charges de l'agriculture biologique (d'après Agreste, Enquête sur les pratiques phytosanitaires en 2010). Des méthodes alternatives ont également été développées pour pallier le manque de solutions durables proposées par les produits phytosanitaires ou limiter l'apparition de résistances.

Dans le cadre de l'agriculture biologique, il est interdit d'utiliser des intrants chimiques de synthèse. La lutte contre le mildiou et l'oïdium repose donc essentiellement sur une conduite de la parcelle limitant les sources d'inoculum et sur la pulvérisation de produits à base de cuivre et de soufre. La différence entre agriculture biologique et agriculture conventionnelle en termes de traitements est plus qualitative que quantitative. En effet, le nombre de passages en agriculture bio est équivalent à celui en agriculture conventionnelle (Ambiaud, 2012). En outre, l'utilisation massive de cuivre et de soufre n'est pas anodine. Le cuivre, un métal lourd, est responsable de la contamination des sols dans les régions viticoles (Baize *et al.*, 2007).

Pour les maladies virales ou bactériennes et les maladies du bois, aucun traitement phytosanitaire n'est utilisable aujourd'hui. La lutte repose donc essentiellement sur la gestion des populations de vecteurs et une conduite de la vigne limitant l'infection en prévention ainsi que sur l'arrachage des plants infectés. La gestion des populations de vecteurs consiste en l'utilisation d'insecticides à base de substances issues de fleurs ou de bactéries. Le soufre a également une action insecticide (Ambiaud, 2012). La lutte contre les maladies virales et bactériennes repose également sur la production et la plantation de plants de vigne sains. Un schéma de certification géré par FranceAgriMer garantit, chez le pépiniériste, des plants indemnes des viroses et bactérioses les plus graves : court-noué, enroulement, flavescence dorée. Par exemple, un traitement de 45 minutes à l'eau chaude (50°C) est réalisé en sortie de pépinière pour éliminer efficacement le phytoplasme de la flavescence dorée (ephytia.inra.fr). Dans le cas de l'esca, une taille tardive et par temps sec avec une protection des plaies de taille permet de limiter les risques d'infection. Enfin, lorsque le pied est infecté, l'arrachage est nécessaire voire imposé. En effet, dans les zones de lutte obligatoire contre la flavescence dorée, il est obligatoire d'arracher les pieds infectés, voire toute la parcelle si le seuil de 20 % de pieds malades est atteint (Arrêté du 9 juillet 2003 relatif à la lutte contre la flavescence dorée de la vigne et contre son agent vecteur). Pour les maladies à vecteur tellurique, la dévitalisation des plants et l'élimination de l'ensemble du système racinaire sont nécessaires. Il est également recommandé de réaliser un repos du sol de 7 ans avant de replanter des vignes (Demangeat *et al.*, 2005).

iv. La création variétale

Un autre moyen de lutte contre les bioagresseurs consiste à utiliser des plantes naturellement résistantes. Ceci permet de réduire, voire de supprimer totalement les traitements phytosanitaires. Suite aux crises sanitaires liées à l'introduction en Europe du mildiou, de l'oïdium et du phylloxéra, la recherche s'est fortement orientée vers la création des variétés résistantes à ces bioagresseurs via l'hybridation (Bouquet, 2009). Le développement d'hybrides producteurs directs, issus de croisements entre des vignes américaines et *V. vinifera*, prend son essor, à la fin du XIX^{ème} siècle, avec des sélectionneurs tels que Georges Couderc ou Albert Seibel (Volle *et al.*, 2007). Cependant, ces hybrides ne satisfont pas les critères de qualité organoleptique des cépages traditionnels et finissent par être fortement décriés. En 1927, une loi sur les appellations introduit la notion d'encépagement et exclut les hybrides des variétés autorisées dans les zones d'appellation (Article 3 de la loi du 22 juillet 1927 tendant à compléter la loi du 6 mai 1919 relative à la protection des appellations d'origine, publiée au Journal officiel du 27 juillet 1927). Les hybrides restent cependant autorisés dans les zones hors appellation. Dans les années 1930, des analyses révèlent un taux de méthanol élevé dans les vins issus de certains hybrides, et notamment ceux issus de croisements avec *V. labrusca*. En 1935, six cépages hybrides sont interdits à la plantation et à la vente : Noah, Clinton, Isabelle, Herbemont, Othello et Jacquez (Article 6 de la loi du 24 décembre 1934 tendant à réaliser l'assainissement du marché des vins, publiée au Journal officiel du 25 décembre 1934 ; Article 1^{er} du décret du 18 janvier 1935, publié au Journal officiel du 24 janvier 1935). En quelques années, le développement des hybrides producteurs directs est complètement stoppé. Suite à cela, la recherche pour la création de variétés

résistantes est abandonnée en France et la lutte contre les maladies et ravageurs se porte vers l'utilisation du greffage et de produits phytosanitaires.

Dans le même temps, des travaux en Russie cherchent à valoriser la tolérance au froid d'une espèce asiatique, *V. amurensis*. Cette espèce, également résistante au mildiou et à l'oïdium est ainsi à l'origine de plusieurs cépages russes (Rousseau & Chanfreau, 2013). Par la suite, ces travaux ainsi que les travaux entrepris par les sélectionneurs français sont repris et poursuivis en Allemagne pour créer de nouvelles variétés résistantes avec de meilleures qualités organoleptiques. (Rousseau & Chanfreau, 2013). Ces travaux aboutissent à la création d'une centaine de variétés, telles que Regent, Bronner ou Solaris, avec un niveau de résistance variable. En effet, les deux-tiers des cépages présentent une résistance partielle élevée au mildiou (note OIV452 supérieure ou égale à 6 sur une échelle de 1 à 9, 1 étant le plus sensible) (Rousseau, 2013). Selon Rousseau (2013), ils permettent néanmoins de réduire la consommation de pesticides avec une moyenne de 0 à 3 traitements selon les modes de production et un maximum de 6 traitements pour les cépages les moins résistants subissant une forte pression. De façon générale, ces cépages sont considérés comme bons avec une qualité gustative comparable à celle des cépages traditionnels (Rousseau, 2013 ; van der Meer *et al.*, 2010).

En France, après l'interdiction des hybrides producteurs directs, les programmes de création variétale sont fortement ralentis. Cependant, à partir des années 1970, des travaux initiés à l'Inra de Montpellier par Alain Bouquet portent sur la valorisation des résistances issues de *M. rotundifolia*, une espèce encore non utilisée dans les programmes de sélection européens (Bouquet, 2009). Cette espèce possède le double avantage d'être cultivée aux États-Unis et de ne pas avoir été utilisée pour le développement des hybrides producteurs directs. La muscadine est donc susceptible d'être plus facilement acceptée par la profession, tout en ayant certaines qualités liées à sa domestication (hermaphrodisme, teneur en jus) (Bouquet, 2009). Depuis le début des années 2000, les programmes de sélection visent à créer une gamme de variétés de seconde génération cumulant plusieurs sources de résistance pour procurer à la vigne une résistance durable au mildiou et à l'oïdium (Merdinoglu *et al.*, 2009). Les quatre premières variétés de vigne seront inscrites au catalogue en 2018.

En parallèle, le greffage s'est imposé comme une solution efficace dans le cadre de la lutte contre le phylloxéra. Il permet notamment une dissociation de la sélection entre le greffon et le porte-greffe. De plus, l'utilisation d'hybrides comme porte-greffe n'impacte pas la qualité de la production. Ainsi, pour éviter la mort des ceps suite à la piqûre du phylloxéra, des porte-greffe résistants ont été développés à la fin du XIX^{ème} siècle et au début du XX^{ème} siècle. Ces porte-greffe étaient issus de vignes américaines telles que *V. berlandieri*, *V. riparia* et *V. rupestris* (Ollat *et al.*, 2016). De même, dans la lutte contre le court-noué, la recherche s'est orientée vers la création de porte-greffe résistants aux nématodes, c'est-à-dire ne permettant pas aux nématodes de s'alimenter sur leurs racines. De nouveau, d'autres espèces sauvages ont été envisagées comme source de résistance, telles que *M. rotundifolia* ou *V. arizonica* (Van Zyl *et al.*, 2014 ; Walker *et al.*, 2014). Un premier porte-greffe résistant, le Nemadex AB, a été développé. Son principal atout est sa résistance partielle au nématode vecteur *X. index*, permettant de retarder le développement des populations de ce nématode et par conséquent l'infection par le virus du court-noué. Cependant, ce porte-greffe est peu vigoureux et sensible à la chlorose calcaire et à l'humidité du sol (Anonyme, 2010).

Parmi les Vitacées, *V. vinifera* apparaît donc comme une espèce cultivée importante par son poids au niveau économique. Cependant, cette espèce originaire d'Europe est attaquée par de nombreux pathogènes. Certains comme le phylloxéra ont pu être maîtrisés. D'autres maladies comme la maladie de Pierce ou les maladies du bois n'ont à l'heure actuelle aucun moyen de lutte efficace, si ce n'est l'arrachage des pieds de vigne infectés. D'autre part, certaines maladies, comme le mildiou ou l'oïdium, considérées comme maîtrisées, nécessitent l'utilisation massive de produits chimiques, ce qui a un coût à la fois économique et environnemental mais également pour la santé humaine. Il

devient donc nécessaire de développer des méthodes de lutte alternatives et innovantes, parmi lesquelles la lutte génétique semble être la plus prometteuse.

2. La lutte génétique par l'utilisation d'espèces sauvages apparentées

L'utilité des espèces sauvages dans les programmes de sélection a été reconnue dès les années 1940-1950 (Hajjar & Hodgkin, 2007). Les espèces sauvages apparentées sont effectivement un réservoir de gènes et de diversité supplémentaire pour les espèces cultivées. Cependant, l'utilisation de ces espèces n'est pas toujours triviale car des barrières reproductives peuvent se dresser entre les espèces.

a. Intérêt des espèces sauvages apparentées

La domestication est la modification d'une espèce sauvage pour créer une nouvelle forme de plante adaptée aux besoins de l'homme (Doebley *et al.*, 2006). La pression de sélection mise en place par l'homme lors de la domestication induit une perte de la diversité génétique dans la plante cultivée par rapport à l'espèce sauvage initiale. La perte de cette diversité est fortement liée à la taille de la population ancestrale lors de la domestication. En effet, plus la population ancestrale est petite, plus la perte de diversité est grande (Wiener & Wilkinson, 2011). Bien que la diversité génétique des espèces cultivées soit généralement plus faible que celle des espèces initiales, une grande variabilité existe. Par exemple, la diversité nucléotidique de l'ancêtre sauvage conservée dans l'espèce cultivée est de 38 % pour la tomate, 51 % pour le concombre, 64 % pour le soja et 83 % pour le maïs (Gaut *et al.*, 2015). Elle atteint même 95 % en moyenne pour les espèces pérennes (Miller & Gross, 2011). Cette valeur élevée s'explique par la domestication plus tardive des espèces pérennes, par le nombre réduit de générations depuis la domestication en raison de phases juvéniles longues et par la pratique de la propagation clonale. De plus, les espèces pérennes sont souvent sensibles à la dépression de consanguinité favorisant le maintien d'un niveau élevé d'hétérozygotie et une plus grande diversité génétique (Gaut *et al.*, 2015). Cependant, l'érosion génétique des espèces cultivées reste un problème, puisqu'elle limite le potentiel pour l'amélioration des cultures.

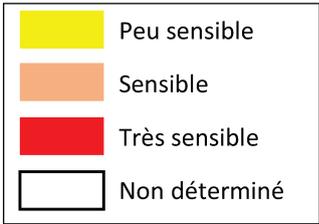
Les espèces sauvages apparentées possédant une plus grande diversité génétique que les espèces cultivées, elles constituent des réservoirs naturels de gènes ou d'allèles (Muñoz *et al.*, 2017). Les espèces les plus proches de l'espèce cultivée sont inter-fertiles et offrent un réservoir primaire de gènes facilement utilisable pour l'amélioration. Des espèces plus éloignées peuvent également être utilisées comme réservoir secondaire, voire tertiaire, à des degrés variés (Harlan & de Wet, 1971). Selon Hajjar & Hodgkin (2007), les espèces sauvages apparentées peuvent apporter cinq types d'amélioration : la résistance aux bioagresseurs, la tolérance aux stress abiotiques, l'augmentation du rendement, la stérilité mâle cytoplasmique et l'amélioration de la qualité. La conservation de ces espèces est donc de première importance. Cette conservation peut se faire par des banques de graines ou des conservatoires de diversité génétique. Des accessions de ces espèces sont ainsi conservées et protégées *ex situ*. De plus, les espèces sauvages continuent d'évoluer sous l'influence de la sélection naturelle dans leur environnement. Elles constituent ainsi une ressource *in situ* en perpétuelle évolution pour l'adaptation aux changements climatiques notamment (Brozynska *et al.*, 2016).

Dans le cas de la résistance aux bioagresseurs chez *V. vinifera*, si très peu de cépages apparaissent résistants, leur niveau de sensibilité est variable (Tableau I.2). La recherche de résistances chez *V. vinifera* a tout de même permis d'identifier un facteur de résistance à l'oïdium *Ren1* chez Kishmish Vatkana, un cépage de cuve originaire du Moyen Orient (Hoffmann *et al.*, 2008). Toutefois,

étant donné le faible niveau de résistance des cépages de *V. vinifera* à ses bioagresseurs, la recherche de résistance s'est plutôt orientée vers les espèces américaines et asiatiques du genre *Vitis*. De nombreux facteurs ont ainsi pu être identifiés pour le mildiou et l'oïdium, et également pour le black-

Tableau I.2. Niveau de sensibilité relatif de différents cépages aux principaux bioagresseurs (Galet, 2000 ; PI@ntGrape, 2011 ; Reynier, 2007 ; Ephytia, 2014)

	Mildiou	Oïdium	Pourriture grise	Black-rot	Eutypiose	Esca	Flavescence dorée
Alicante Bouschet	Très sensible	Peu sensible			Sensible		Très sensible
Aligoté	Très sensible	Peu sensible	Très sensible	Très sensible			
Auxerrois	Très sensible		Très sensible				
Baroque	Peu sensible	Peu sensible	Très sensible	Peu sensible			
Cabernet Franc	Sensible	Très sensible		Sensible	Sensible		
Cabernet Sauvignon	Sensible	Très sensible	Peu sensible	Sensible	Très sensible		
Carignan	Sensible	Très sensible	Peu sensible				
Castets	Peu sensible	Très sensible	Sensible		Sensible		
Chardonnay	Peu sensible	Très sensible	Très sensible	Peu sensible			Sensible
Chasan	Sensible	Très sensible	Peu sensible				
Chasselas	Sensible		Peu sensible		Sensible		
Chenin	Sensible	Très sensible	Très sensible	Sensible	Très sensible		
Cinsault	Sensible	Très sensible	Très sensible	Sensible	Très sensible		
Clairette	Sensible	Peu sensible	Peu sensible				
Dabouki	Sensible		Sensible				
Danlas	Très sensible	Très sensible	Peu sensible				
Duras	Peu sensible	Très sensible		Très sensible	Très sensible		
Durif	Peu sensible		Sensible	Sensible	Sensible		
Ferradou	Peu sensible	Peu sensible	Peu sensible		Sensible		
Feteasca neagra	Sensible	Peu sensible	Sensible				
Folle blanche	Sensible	Peu sensible	Très sensible	Très sensible	Sensible		
Gamay		Sensible	Sensible		Sensible		
Gewurztraminer	Sensible	Sensible	Sensible				
Grenache	Très sensible	Peu sensible	Sensible				
Jurançon	Sensible		Sensible		Peu sensible		
Mauzac	Peu sensible	Peu sensible			Sensible		
Melon	Très sensible	Peu sensible	Très sensible		Peu sensible		
Merlot	Très sensible	Peu sensible	Sensible		Peu sensible		Peu sensible
Meslier Saint-François	Peu sensible	Sensible	Sensible	Peu sensible			
Monbadon	Peu sensible	Peu sensible	Sensible				
Mondeuse	Sensible	Sensible	Peu sensible				
Mourvèdre	Sensible	Sensible	Peu sensible			Sensible	
Muscadelle		Sensible	Très sensible		Sensible		
Niellucio		Sensible	Peu sensible				Très sensible
Riesling	Sensible	Sensible	Très sensible				
Rivairenc	Très sensible	Très sensible	Peu sensible				
Sauvignon	Peu sensible	Sensible	Très sensible	Très sensible	Très sensible		
Sémillon	Peu sensible	Peu sensible	Sensible	Peu sensible			
Sultanine	Très sensible	Très sensible	Très sensible				
Sylvaner	Très sensible	Très sensible	Très sensible		Peu sensible		
Tempranillo			Peu sensible		Très sensible		
Ugni blanc	Sensible	Peu sensible	Peu sensible		Sensible		



rot, la maladie de Pierce, *X. index* et le phylloxéra (Tableau I.3). Certains de ces locus de résistance ont été détectés dans différentes accessions. Ainsi, le locus *Rpv3*, conférant une résistance majeure au mildiou, a été identifié chez deux variétés issues de croisements interspécifiques, Bianca et Regent (Bellin *et al.*, 2009 ; Welter *et al.*, 2007). Il pourrait être présent chez différentes espèces de *Vitis* : *V. rupestris*, *V. lincecumii*, *V. labrusca* et *V. riparia* (Di Gaspero *et al.*, 2012 ; Zyprian *et al.*, 2016). Plusieurs variétés présentant des résistances au mildiou et à l'oïdium ont été déployées en Europe de l'Est, telles que Bianca, Regent ou Solaris. Bianca est une variété issue de Villard blanc une obtention de Seyve-Villard, elle-même obtenue grâce à des croisements interspécifiques impliquant *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* et *V. lincecumii* (Di Gaspero *et al.*, 2002). Regent est une variété issue du croisement entre l'hybride de *V. vinifera* (Sylvaner x Müller-Thurgau) et l'hybride interspécifique Chambourcin (Galet, 2000). Chambourcin et Regent possèdent une ascendance complexe impliquant plusieurs espèces de *Vitis* : *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. lincecumii*, *V. riparia* et *V. rupestris* (Eibach & Töpfer, 2003). Solaris est une variété allemande en partie dérivée de l'espèce asiatique *V. amurensis* et d'espèces de *Vitis* américaines (Schwander *et al.*, 2012).

Les espèces sauvages apparentées représentent donc une source non négligeable de gènes pour l'amélioration des espèces cultivées. Cependant, pour certaines cultures, y compris la vigne, leur utilisation dans les programmes de sélection et dans les variétés cultivées reste anecdotique ou commence à peine à être explorée.

b. Problèmes liés à l'hybridation interspécifique

Le principal problème lié à l'hybridation interspécifique pour le développement de nouvelles variétés cultivées est la présence de caractères défavorables transmis par l'espèce sauvage. En effet, la domestication des plantes cultivées a permis la sélection de caractères adaptés à l'agriculture. Ces caractères portent notamment sur l'amélioration et la stabilisation des rendements, des qualités organoleptiques et des qualités technologiques liées à la transformation. Cette sélection n'a en revanche pas eu lieu pour les espèces sauvages apparentées qui portent donc un certain nombre de caractères considérés comme impropres à la culture. Par exemple, *V. vinifera* ssp. *sylvestris* est une espèce dioïque produisant de petites grappes avec des baies petites et pauvres en pulpe alors que *V. vinifera* ssp. *sativa* est hermaphrodite et produit de grosses grappes avec des baies riches en pulpe et en jus (This *et al.*, 2006). De même, le téosinte, considéré comme l'ancêtre du maïs, développe des inflorescences petites avec des graines enfermées dans une glume dure (Doebley & Stec, 1991). L'inflorescence du téosinte est donc très éloignée de celle du maïs qui porte plusieurs rangs de graines nues, facilitant leur consommation (Doebley & Stec, 1991).

Lors d'un croisement, l'hybride obtenu possède des caractères de ses deux parents. L'élimination des caractères de l'un des parents au profit de ceux de l'autre parent est une pratique courante en sélection. Elle repose sur le croisement en retour de l'hybride avec le parent porteur des caractères que l'on souhaite garder. Ce dernier est appelé parent récurrent alors que l'autre parent est le parent donneur. Cette technique dite de rétrocroisement, ou backcross, consiste, statistiquement, en l'élimination de la moitié du génome du parent donneur, à chaque génération successive. L'objectif d'une succession de rétrocroisements est de générer des individus possédant toutes les caractéristiques du parent récurrent, associées au caractère d'intérêt du parent donneur. Lorsque les deux parents appartiennent à deux espèces différentes, on parle d'introgression. L'introgression est une technique parfaitement adaptée pour l'utilisation des espèces sauvages apparentées dans les programmes d'amélioration des plantes cultivées. L'espèce cultivée prend alors le rôle de parent récurrent et l'espèce sauvage apparentée celui de parent donneur. Dans ce cas, le parent récurrent peut être différent à chaque génération, c'est-à-dire que l'on change de variété à chaque génération de croisement. On parle alors de pseudo-récroisement, ou pseudo-backcross.

Tableau I.3. Facteurs de résistance identifiés chez les Vitis

Maladie	Facteur	Position (marqueur proche)	Source de la résistance	Référence
Mildiou	<i>Rpv1</i>	12 (VMC4f3.1)	<i>M. rotundifolia</i> cv. Trayshed	Merdinoglu <i>et al.</i> , 2003 ; Wiedemann-Merdinoglu <i>et al.</i> , 2006
	<i>Rpv2</i>	18 (VVIn16)	<i>M. rotundifolia</i> cv. Trayshed	Wiedemann-Merdinoglu <i>et al.</i> , 2006
	<i>Rpv3</i>	18 (UDV305/VMC7f2)	Bianca	Bellin <i>et al.</i> , 2009
		18 (UDV112)	Regent	Fischer <i>et al.</i> , 2004 ; Welter <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rpv4</i>	4 (VMC7h3/VMCNg2e1)	Regent	Welter <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rpv5</i>	9 (VVlo52b)	<i>V. riparia</i> cv. Gloire de Montpellier	Marguerit <i>et al.</i> , 2009
	<i>Rpv6</i>	12 (VMC8g9)	<i>V. riparia</i> cv. Gloire de Montpellier	Marguerit <i>et al.</i> , 2009
	<i>Rpv7</i>	7 (UDV097)	Bianca	Bellin <i>et al.</i> , 2009
	<i>Rpv8</i>	14 (Chr14V015)	<i>V. amurensis</i> cv. Ruprecht	Blasi <i>et al.</i> , 2011
	<i>Rpv9</i>	7 (CCoAOMT)	<i>V. riparia</i>	Moreira <i>et al.</i> , 2011
	<i>Rpv10</i>	9 (GF09-046)	<i>V. amurensis</i> (Solaris)	Schwander <i>et al.</i> , 2012
	<i>Rpv12</i>	14 (UDV014/UDV370)	<i>V. amurensis</i> cv. Ruprecht	Venuti <i>et al.</i> , 2013
	<i>Rpv13</i>	12 (VMC1g3.2)	<i>V. riparia</i>	Moreira <i>et al.</i> , 2011
	<i>Rpv14</i>	5 (GF05-13)	<i>V. cinerea</i> cv. Arnold	Ochssner <i>et al.</i> , 2016
	<i>Rpv15</i>	18	<i>V. piasezkii</i>	Pap <i>et al.</i> (en préparation)
Oïdium	<i>Ren1</i>	13 (VMC9h4.2/VMCNG4e10.1/UDV020)	<i>V. vinifera</i> cv. Kishmish vatkana	Hoffmann <i>et al.</i> , 2008
	<i>Ren2</i>	14 (CS25b)	Illinois 547-1 (<i>V. rupestris</i> x <i>V. cinerea</i>)	Dalbó <i>et al.</i> , 2001
	<i>Ren3</i>	15 (R1070)	Regent	Fischer <i>et al.</i> , 2004 ; Welter <i>et al.</i> , 2007
	<i>Ren4</i>	18 (VMC7f2)	<i>V. romanetii</i>	Ramming <i>et al.</i> , 2011 ; Riaz <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ren5</i>	14 (VMC9c1)	<i>M. rotundifolia</i> cv. Regale	Blanc <i>et al.</i> , 2012
	<i>Ren6</i>	9 (PN9-057/PN9-068)	<i>V. piasezkii</i>	Pap <i>et al.</i> , 2016
	<i>Ren7</i>	19 (VVIp17.1/VMC9a2.1/VMC5h11)	<i>V. piasezkii</i>	Pap <i>et al.</i> , 2016
	<i>Ren8</i>	18	(Bacchus x Seyval) x Villard blanc	Zyprian <i>et al.</i> , 2016
	<i>Run1</i>	12 (VMC4f3.1)	<i>M. rotundifolia</i> cv. G52	Barker <i>et al.</i> , 2005 ; Pauquet <i>et al.</i> , 2001
	<i>Run2.1</i>	18 (VMC7f2)	<i>M. rotundifolia</i> cv. Magnolia	Riaz <i>et al.</i> , 2011
	<i>Run2.2</i>	18 (VMC7f2)	<i>M. rotundifolia</i> cv. Trayshed	Riaz <i>et al.</i> , 2011
Black-rot	<i>Rgb1</i>	14 (GF14-42)	Börner (<i>V. riparia</i> x <i>V. cinerea</i>)	Rex <i>et al.</i> , 2014
	<i>Rgb2</i>	16 (VChr16c-158)	Börner (<i>V. riparia</i> x <i>V. cinerea</i>)	Rex <i>et al.</i> , 2014
Maladie de Pierce	<i>PdR1</i>	14 (VMCNg3h8/VVIn64) 2 QTL	<i>V. arizonica</i>	Riaz <i>et al.</i> , 2006 ; Riaz <i>et al.</i> , 2008
<i>X. index</i>	<i>XiR1</i>	19 (VMC5a10)	<i>V. arizonica</i>	Xu <i>et al.</i> , 2008
Phylloxéra		13 (Gf13-9)	<i>V. cinerea</i> cv. Arnold	Zhang <i>et al.</i> , 2009

Un deuxième obstacle à l'utilisation des espèces apparentées est l'existence de barrières interspécifiques limitant les croisements entre espèces cultivées et espèces apparentées. Ces barrières à l'hybridation, ou mécanismes d'isolement, prennent différentes formes qui ont été décrites par Dillemann (1954). Dans un premier temps, les barrières peuvent être externes à l'hybridation, c'est-à-dire liées aux conditions de pollinisation. En effet, pour qu'il y ait pollinisation, différentes conditions doivent être remplies : réunion géographique, concordance des époques de floraison, morphologie florale adaptée, agent pollinisateur commun. Dans un second temps, lorsque toutes les barrières externes sont levées, des barrières internes à l'hybridation liées à l'inter-fécondabilité des espèces peuvent survenir à différentes étapes du croisement. Des barrières pré- ou post-zygotiques peuvent empêcher la fécondation ou la production de graines. Ces barrières agissent sur la germination du grain de pollen sur le stigmate, la croissance du tube pollinique, la fécondation, le développement de l'embryon ou de l'albumen. Si les barrières pré- et post-zygotiques ont été franchies, d'autres barrières peuvent impacter la viabilité des hybrides ou encore leur fertilité, variant de la stérilité totale à la fertilité complète. Une fertilité partielle est généralement observée, avec des variations en fonction des parents utilisés pour chaque espèce. La stérilité de l'hybride peut avoir une origine génétique ou chromosomique. La stérilité génétique est causée par l'arrêt du développement des organes sexuels ou des anomalies lors de la division méiotique contrôlées par des gènes. La stérilité chromosomique en revanche est due à une trop grande divergence des chromosomes des parents de l'hybride. L'appariement des chromosomes lors de la méiose est imparfait. La méiose est alors bloquée, empêchant la production de gamètes, ou la répartition des chromosomes est déséquilibrée, aboutissant à la production de gamètes non fonctionnels dans la majorité des cas. Enfin, un phénomène de dépression hybride peut se manifester dans les générations suivantes sous forme d'une faible vigueur des plantes (Louarn, 1992).

La présence de mécanismes d'isolement est nécessaire à la spéciation. Il n'est donc pas surprenant que des barrières surviennent lors des croisements entre espèces cultivées et espèces apparentées. Cependant, l'utilisation des espèces sauvages apparentées étant courante dans les programmes de sélection, il est intéressant d'étudier, chez les espèces cultivées, si les barrières à l'hybridation ont pu être franchies et comment elles l'ont été.

c. Utilisation des espèces apparentées chez d'autres espèces cultivées

Les potentialités des espèces sauvages apparentées ainsi que les moyens nécessaires à mettre en place pour leur valorisation dans les programmes de sélection d'espèces cultivées sont présentés. Les espèces choisies ici permettent de dresser une vision générale allant de la valorisation directe d'une large gamme d'espèces sauvages apparentées à un nombre restreint d'espèces disponibles en raison de fortes barrières interspécifiques.

i. La tomate

La tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill., appartient à la famille des Solanacées. La variabilité de *L. esculentum* étant réduite, les espèces sauvages apparentées ont été largement utilisées (Philouze & Laterrot, 1992) pour introduire chez la tomate des gènes de résistance aux maladies principalement, mais également des caractères liés à la qualité du fruit et à la tolérance de la plante aux stress abiotiques (Tableau I.4). De façon générale, toutes les espèces du genre *Lycopersicon* peuvent s'hybrider avec *L. esculentum*, avec parfois recours au sauvetage d'embryon (Stevens *et al.*, 1986) (Figure I.9). Ceci facilite grandement l'introduction de caractères issus de ces espèces vers la tomate cultivée. Les espèces sauvages apparentées ont ainsi été largement utilisées dans les programmes d'amélioration de la tomate pour le développement de nouvelles variétés (Anonyme, 2013).

Tableau I.4. Exemples d'apports des espèces apparentées à la tomate (Anonyme, 2013 ; Philouze & Laterrot, 1992 ; Stevens et al., 1986)

Espèce apparentée	Caractères d'intérêt
<i>Lycopersicon cheesmanii</i>	Pas de zone d'abscission, tolérance au sel, résistance à la mineuse des feuilles, au virus du <i>Tomato Yellow Leaf Curl</i>
<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	Résistance à de nombreuses maladies, couleur et composition du fruit
<i>Lycopersicon chmielewskii</i>	Composition et couleur du fruit
<i>Lycopersicon parviflorum</i>	Composition et couleur du fruit
<i>Lycopersicon hirsutum</i>	Résistance au virus de la mosaïque du concombre, au virus Y de la pomme de terre, au virus du <i>Tomato Yellow Leaf Curl</i> , à la mineuse des feuilles, aux basses températures, coloration du fruit
<i>Solanum pennellii</i>	Résistance à la sécheresse, à la fusariose, teneur en sucre et en vitamines
<i>Lycopersicon chilense</i>	Résistance à la sécheresse, au froid, à l'oïdium, au virus du <i>Tomato Yellow Leaf Curl</i> ¹
<i>Lycopersicon peruvianum</i>	Résistance au virus du <i>Tomato Spotted Wilt</i> , au virus de la mosaïque, au virus du <i>Tomato Yellow Leaf Curl</i> , aux nématodes, teneur en vitamine C
<i>Solanum habrochaites</i>	Résistance à <i>Phytophthora infestans</i> ² , rendement ² , taille ² et qualité du fruit ²
<i>Solanum lycopersicoides</i>	Tolérance au froid

¹Zamir et al., 1994, ²Haggard et al., 2013

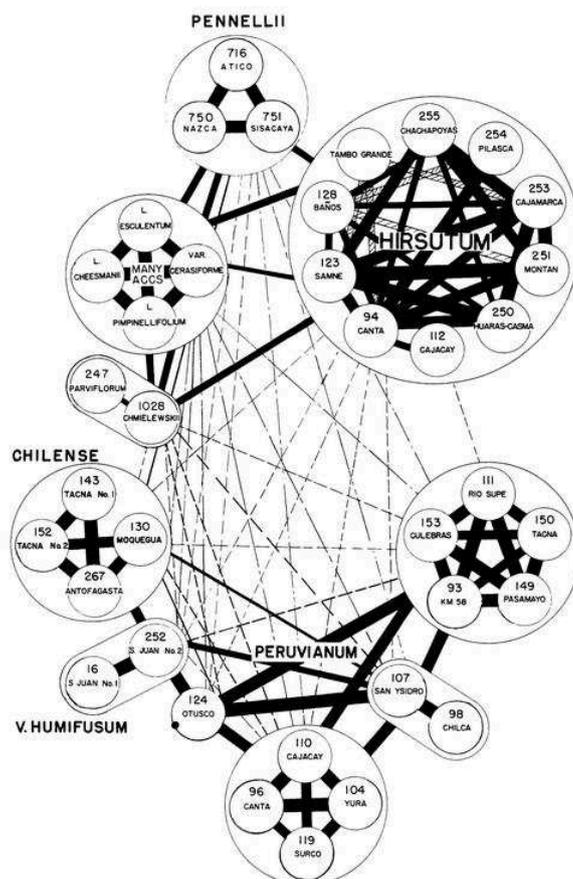


Figure I.9. Possibilités de croisements entre différentes accessions d'espèces du genre *Lycopersicon* (Stevens et al., 1986)

Les croisements compatibles sont symbolisés par des lignes pleines, les croisements incompatibles par des lignes pointillées et les croisements produisant des hybrides F1 grâce au sauvetage d'embryon en lignes point-tiret. Les cercles regroupent des accessions complètement inter-fertiles.

ii. Le colza

Le colza, *Brassica napus*, est une crucifère obtenue par hybridation naturelle du chou (*B. oleracea*) avec la navette (*B. rapa*) (Figure I.10). U (1935) a établi les diverses relations existant entre six espèces du genre *Brassica*, auxquelles appartiennent le colza et la moutarde jaune, *B. juncea*. Ainsi, les espèces allotétraploïdes *B. napus*, *B. juncea* et *B. carinata* sont issues d'hybridations naturelles entre les espèces diploïdes *B. rapa*, *B. nigra* et *B. oleracea*. Des croisements entre les différentes espèces impliquées dans le triangle de U sont fréquemment réalisés pour introduire des caractères d'intérêt, et notamment les résistances aux maladies et ravageurs (Tableau I.5). Les parents du colza peuvent également être utilisés comme espèces ponts pour l'introduction de caractères d'autres genres tels que *Raphanus* (Chen & Wu, 2008). Des hybrides interspécifiques entre *B. oleracea* et *R. sativus* ont ainsi été générés pour l'introgession de la stérilité mâle cytoplasmique ou de la résistance à la hernie dans les espèces du genre *Brassica*. Cependant, la faible fertilité des hybrides obtenus a limité leur utilisation (Chen & Wu, 2008).

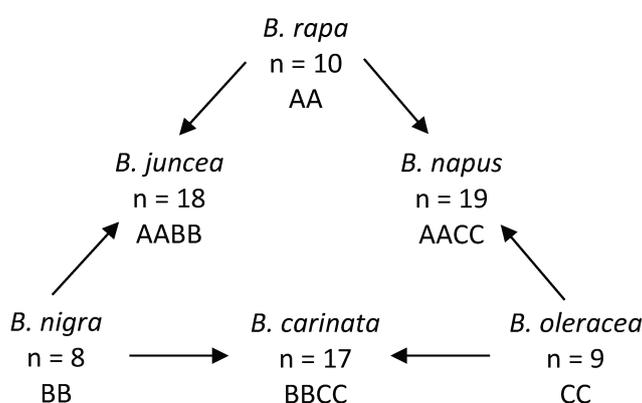


Figure I.10. Triangle de U des Brassicacées (U, 1935)

Tableau I.5. Exemples d'apports des espèces apparentées au colza

Espèce apparentée	Caractères d'intérêt	Références
<i>Brassica rapa</i>	Auto-incompatibilité, résistance à la hernie	Banks & Beversdorf, 1987 ; Suwabe <i>et al.</i> , 2003
<i>Brassica juncea</i>	Résistance à <i>Leptosphaeria maculans</i> , à <i>Phoma lingam</i>	Chèvre <i>et al.</i> , 1997 ; Roy, 1984 ; Sacristán & Gerdemann, 1986
<i>Brassica nigra</i>	Résistance à <i>L. maculans</i> à <i>P. lingam</i>	Chèvre <i>et al.</i> , 1996 ; Zhu <i>et al.</i> , 1993
<i>Brassica campestris</i>	Résistance à la hernie	Goodman <i>et al.</i> , 1987
<i>Raphanus sativus</i>	Stérilité mâle cytoplasmique, restaurateur de fertilité, résistance à la hernie	Bannerot <i>et al.</i> , 1974 ; Kamei <i>et al.</i> , 2010 ; Pellan-Delourme & Renard, 1988
<i>Sinapis alba</i>	Résistance à <i>Heterodera schachtii</i>	Lelivelt <i>et al.</i> , 1993
<i>Sinapis arvensis</i>	Résistance à <i>L. maculans</i>	Snowdon <i>et al.</i> , 2000
<i>Diplotaxis eruroides</i>	Résistance à <i>Alternaria</i>	Garg <i>et al.</i> , 2007

iii. Les blés

Les blés sont des Poacées appartenant au genre *Triticum*. Au sein de ce genre, quatre espèces sont cultivées (Auriau *et al.*, 1992) : *T. monococcum* ($2n = 2x = 14$, génome AA), *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$, génome AABB), dont *T. turgidum* ssp. *turgidum* conv. *durum*, le blé dur, *T. timopheevii* ($2n = 4x = 28$, génome GGAA) et *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, génome AABBDD), le blé tendre. Le blé tendre est un allohexaploïde issu de l'hybridation de trois espèces : *T. urartu* (AA), une espèce apparentée à *Ae.*

speltoides (BB) et *Ae. Tauschii* (DD) (Feldman *et al.*, 2012). De nombreux gènes de résistance ont été identifiés chez *T. aestivum*. Cependant, les espèces apparentées sont une importante source de gènes pour la résistance mais également pour l'augmentation des rendements, la tolérance au froid, au sel ou la teneur en protéines du blé (Wulff & Moscou, 2014). Ainsi, 52 espèces apparentées ont déjà été utilisées pour l'introgression de caractères chez le blé. Ces espèces sont issues de 13 genres différents : *Aegilops*, *Agropyron*, *Ambylopyrum*, *Dasypyrum*, *Elymus*, *Hordeum*, *Leymus*, *Lophopyrum*, *Psathyrostachys*, *Pseudoroegneria*, *Secale*, *Thinopyrum* et *Triticum* (Wulff & Moscou, 2014) (Tableau I.6).

Toutefois, l'utilisation des espèces apparentées est limitée par le manque d'appariement des chromosomes, des phénomènes de stérilité et de suppression des recombinaisons (Wulff & Moscou, 2014). Chez le blé, l'appariement des chromosomes pendant la méiose est contrôlé par les gènes *Ph1* et *Ph2*, qui empêchent les recombinaisons interspécifiques (Wulff & Moscou, 2014). Le doublement des chromosomes, grâce à un traitement à la colchicine par exemple, est une technique très utilisée permettant de produire des amphiploïdes fertiles (Wulff & Moscou, 2014).

Tableau I.6. Exemples d'apports des espèces apparentées au blé (Aktar-Uz-Zaman *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2016 ; Nevo & Chen, 2010)

Espèce apparentée	Caractères d'intérêt
<i>Triticum aestivum</i>	Résistance à la rouille brune, à la rouille noire, à la rouille jaune, à l'oïdium, tolérance au sel, à la sécheresse
<i>Triticum dicoccoides</i>	Résistance à la rouille brune, à la rouille jaune, tolérance au sel, à la sécheresse
<i>Triticum durum</i>	Résistance à la rouille brune, à la rouille noire, au sel
<i>Triticum monococcum</i>	Résistance à la rouille brune, à la rouille noire, tolérance au sel
<i>Triticum timopheevii</i>	Résistance à la rouille noire, à l'oïdium, tolérance au sel, stérilité mâle génocyttoplasmique ¹
<i>Aegilops comosa</i>	Résistance à la rouille jaune, tolérance au sel
<i>Aegilops elongatum</i>	Résistance à la rouille brune, tolérance au sel
<i>Aegilops geniculata</i>	Résistance à la rouille noire, tolérance au sel
<i>Aegilops longissima</i>	Résistance à l'oïdium, tolérance au sel
<i>Aegilops searsii</i>	Résistance à la rouille noire, tolérance au sel
<i>Aegilops speltoides</i>	Résistance à la rouille brune, à la rouille noire, à l'oïdium, tolérance à la sécheresse
<i>Aegilops tauschii</i>	Résistance à la rouille brune, à la rouille noire, à la rouille jaune, à l'oïdium, tolérance au sel
<i>Aegilops umbellulata</i>	Résistance à la rouille brune, tolérance au sel
<i>Aegilops ventricosa</i>	Résistance à la rouille brune, à la rouille jaune
<i>Agropyron cristatum</i>	Résistance à l'oïdium
<i>Agropyron elongatum</i>	Résistance à la rouille noire, tolérance au sel
<i>Agropyron intermedium</i>	Résistance à la rouille brune
<i>Dasypyrum villosum</i>	Résistance à la rouille noire, à l'oïdium
<i>Haynaldia villosa</i>	Résistance à la rouille jaune
<i>Secale cereale</i>	Résistance à la rouille brune, à la rouille noire, à la rouille jaune, à l'oïdium
<i>Thinopyrum intermedium</i>	Résistance à la rouille noire, à l'oïdium

¹ Wilson & Ross, 1962

iv. Le riz

Le riz appartient à la famille des Poacées. Parmi les 22 espèces du genre *Oryza*, deux espèces sont cultivées : *O. glaberrima* Steud. en Afrique et *O. sativa* L. dans le reste du monde (Brar & Khush, 1997 ; Demol *et al.*, 2002). Dix types de génomes ont été identifiés. Ils permettent de différencier les espèces en trois réservoirs de gènes selon le degré de facilité des croisements avec *O. sativa* (Ge *et al.*, 1999). Le réservoir primaire est composé des espèces possédant le génome AA, faciles à croiser avec *O. sativa*. Le réservoir secondaire est composé des espèces possédant les génomes BB à EE. Le réservoir

tertiaire est composé de toutes les autres espèces du genre (Ge *et al.*, 1999). Ces deux derniers réservoirs nécessitent le recours au sauvetage d'embryon pour la réussite des croisements (Brar & Khush, 1997). Chez le riz, la diversité génétique pour certains caractères, comme la résistance aux maladies, la tolérance à la salinité et à l'acidité des sols, est limitée. Les espèces apparentées sont donc une importante source de gènes (Tableau I.7). Bien que les croisements avec les espèces des réservoirs secondaires et tertiaires soient difficiles, la présence chez ces espèces de résistances à certaines maladies stimule, chez les sélectionneurs, les efforts d'hybridation.

Tableau I.7. Exemples d'apports des espèces apparentées au riz

Espèce apparentée	Génome	Caractères d'intérêt	Référence
<i>Oryza glaberrima</i>	AA	Qualité du grain	Aluko <i>et al.</i> , 2004
<i>Oryza nivara</i>	AA	Résistance au virus du rabougrissement	Ling <i>et al.</i> , 1970
<i>Oryza longistaminata</i>	AA	Résistance à <i>Xanthomonas oryzae</i>	Khush <i>et al.</i> , 1990
<i>Oryza perennis</i>	AA	Stérilité mâle	Dalmacio <i>et al.</i> , 1995
<i>Oryza glumaepatula</i>	AA	Stérilité mâle, rendement	Brondani <i>et al.</i> , 2002 ; Dalmacio <i>et al.</i> , 1996
<i>Oryza rufipogon</i>	AA	Résistance à la maladie du <i>Tungro</i> , croissance, tolérance aux sols acides, amélioration du rendement	Brar & Khush, 1997 ; Thalapati <i>et al.</i> , 2012
<i>Oryza meridionalis</i>	AA	Tolérance à la chaleur	Scafaro <i>et al.</i> , 2010
<i>Oryza officinalis</i>	CC	Résistance à <i>Nilaparvata lugens</i> et à <i>Sogatella furcifera</i>	Jena & Khush, 1990
<i>Oryza granulata</i>	GG	Résistance à <i>N. lugens</i>	Elloran <i>et al.</i> , 1992
<i>Oryza australiensis</i>	EE	Résistance à <i>X. oryzae</i> et à <i>N. lugens</i>	Multani <i>et al.</i> , 1994
<i>Oryza brachyantha</i>	FF	Résistance à <i>X. oryzae</i>	Brar <i>et al.</i> , 1996
<i>Oryza minuta</i>	BBCC	Résistance à <i>X. oryzae</i> , à la pyriculariose et à <i>N. lugens</i>	Amante-Bordeos <i>et al.</i> , 1992 ; Brar <i>et al.</i> , 1996 ; Rahman <i>et al.</i> , 2011
<i>Oryza latifolia</i>	CCDD	Résistance à <i>X. oryzae</i> , à <i>N. lugens</i> et à <i>S. furcifera</i>	Brar & Khush, 1997
<i>Porteresia coarctata</i>	HHKK	Tolérance au sel	Sengupta & Majumder, 2010

v. Le tournesol

Le tournesol, *Helianthus annuus* var. *macrocarpus* (DC) Ckll., est une plante appartenant à la famille des Astéracées. Sa sensibilité à de nombreux pathogènes est le facteur limitant aujourd'hui le rendement et la qualité de l'huile. Cependant, la diversité génétique de l'espèce est faible, nécessitant l'utilisation d'espèces sauvages apparentées pour l'amélioration du tournesol (Atlagić, 2004).

H. annuus peut être croisé avec toutes les espèces sauvages annuelles du genre *Helianthus* (Chandler *et al.*, 1986). Toutefois, ces espèces sont généralement sensibles aux mêmes pathogènes. Les espèces annuelles sont donc plus utilisées pour l'introduction de la stérilité mâle cytoplasmique ou pour la tolérance aux stress abiotiques (Tableau I.8). Parmi les espèces pérennes, les croisements avec les espèces diploïdes sont difficiles (Atlagić, 2004) et ceux avec les espèces tétraploïdes et hexaploïdes nécessitent le sauvetage d'embryon (Kräuter *et al.*, 1991). La culture d'embryon a permis des croisements avec *H. mollis* et *H. maximiliani* pour l'introduction de caractères de résistance aux maladies et de stérilité mâle cytoplasmique, mais les hybrides sont très peu fertiles (Atlagić, 2004 ; Kräuter *et al.*, 1991). D'autre part, les hybrides obtenus lors de croisements avec des espèces hexaploïdes sont stériles en raison d'anomalies de méiose (Atlagić, 2004).

Tableau I.8. Exemples d'apports des espèces apparentées au tournesol (Atlagić, 2004 ; Hajjar & Hodgkin, 2007 ; Prasad et al., 2017)

Espèce apparentée	Type	Caractères d'intérêt
<i>Helianthus petiolaris</i>	Annuelle	Stérilité mâle cytoplasmique
<i>Helianthus argophyllus</i>	Annuelle	Stérilité mâle cytoplasmique
<i>Helianthus paradoxus</i>	Annuelle	Tolérance au sel
<i>Helianthus praecox</i>	Annuelle	Résistance au mildiou, à la rouille, à la verticillose et à l'orobranche
<i>Helianthus giganteus</i>	Pérenne diploïde	Résistances
<i>Helianthus maximiliani</i>	Pérenne diploïde	Résistances
<i>Helianthus salicifolius</i>	Pérenne diploïde	Rendement en huile
<i>Helianthus mollis</i>	Pérenne diploïde	Nouveaux « idiotypes »
<i>Helianthus strumosus</i>	Pérenne tétraploïde	Résistance à l'alternariose
<i>Helianthus tuberosus</i>	Pérenne hexaploïde	Résistance à l'orobranche, à l'alternariose
<i>Helianthus resinosus</i>	Pérenne hexaploïde	Résistances, taux d'acide oléique dans les graines
<i>Helianthus pauciflorus</i>	Pérenne hexaploïde	Résistances, taux de protéines dans les graines

vi. La pomme de terre

La pomme de terre, *Solanum tuberosum* L., appartient à la famille des Solanacées. Les espèces du genre *Solanum* ont une reproduction allogame du fait d'une forte auto-incompatibilité gamétophytique (Bradshaw *et al.*, 2006). Ceci est à l'origine d'une grande diversité génétique. Les espèces sauvages apparentées ont constitué, depuis le début du XX^{ème} siècle, une importante source de diversité, notamment dans le cadre de la résistance aux maladies (Tableau I.9). Toutefois, pendant longtemps, leur utilisation a été limitée à quelques espèces en raison de la difficulté à obtenir des hybrides interspécifiques (Bradshaw *et al.*, 2006).

Les échecs pour l'obtention d'hybrides interspécifiques ont principalement été attribués à des défauts de développement des graines. Chez les végétaux, la production d'une graine est le résultat d'une double fécondation : un des deux gamètes mâles (1x) féconde l'oosphère (1x) et l'autre féconde la cellule centrale (2x). Cette double fécondation aboutit à la formation d'un embryon (2x) et d'un albumen (3x). Des études, menées sur la pomme de terre au début des années 1980, ont prouvé que le bon développement de l'albumen était crucial pour la réussite d'un croisement et qu'il nécessitait un ratio de 2:1 entre le génome maternel et le génome paternel (Ortiz & Ehlenfeldt, 1992). Cette balance entre les génomes parentaux ne reflète pas nécessairement le niveau de ploïdie réel de chaque parent. Ainsi, deux parents diploïdes peuvent ne pas produire d'hybride. Un niveau effectif de ploïdie (EBN) a été établi pour chaque espèce en fonction de ses possibilités de croisement avec les autres espèces (Ortiz & Ehlenfeldt, 1992). Par exemple, les croisements entre *S. brevidens*, 2x(1EBN), et *S. chacoense*, 2x(2EBN), aboutissent à un échec. En revanche, un traitement de *S. brevidens* à la colchicine, pour doubler son nombre chromosomique, ou l'utilisation de gamètes 2n permettent d'aboutir à la production d'un hybride triploïde 3x(2EBN) (Ortiz & Ehlenfeldt, 1992). La mise en évidence du principe du nombre d'équilibre de l'albumen (*Endosperm Balance Number*, EBN) a permis de développer de nouvelles stratégies de croisements, notamment grâce à l'utilisation d'espèces ponts (Bradshaw *et al.*, 2006) (Figure I.11). D'autres techniques telles que la fusion de protoplastes ont été mise au point pour la production d'hybrides à partir d'un parent tétraploïde (4EBN) et d'un parent diploïde (1EBN) (Bradshaw *et al.*, 2006). Par ailleurs, contrairement à beaucoup d'espèces cultivées, la pomme de terre est essentiellement multipliée par reproduction végétative et seul le tubercule est consommé. Les problèmes liés à la stérilité des hybrides sont donc moins contraignants (Rousselle *et al.*, 1992).

Tableau I.9. Exemples d'apports des espèces apparentées à la pomme de terre (Bradshaw et al., 2006 ; Bradshaw & Ramsey, 2005 ; Hanneman, 1994 ; Ross, 1979)

Espèce apparentée	Ploïdie	Caractères d'intérêt
<i>Solanum acaule</i>	4x(2EBN)	Résistance au virus X, au virus de l'enroulement, tolérance au froid ¹
<i>Solanum chacoense</i>	2x(2EBN)	Résistance aux virus, au mildiou
<i>Solanum spegazzinii</i>	2x(2EBN)	Résistance aux nématodes à kystes, à la gale
<i>Solanum vernei</i>	2x(2EBN)	Résistance aux nématodes à kystes, teneur en amidon
<i>Solanum bulbocastanum</i>	2x(1EBN)	Résistance au mildiou
<i>Solanum demissum</i>	6x(4EBN)	Résistance au mildiou, au virus de l'enroulement, vigueur hybride
<i>Solanum kurtzianum</i>	2x(2EBN)	Résistance aux nématodes à kystes
<i>Solanum multidissectum</i>	2x(2EBN)	Résistance aux nématodes à kystes
<i>Solanum oplocense</i>	6x(4EBN)	Résistance aux nématodes à kystes
<i>Solanum stoloniferum</i>	4x(2EBN)	Résistance aux virus A et Y, au mildiou
<i>Solanum brevidens</i>	2x(1EBN)	Résistance aux nématodes à kystes, au virus de l'enroulement ²

¹Hawkes et al., 2012, ²Austin et al., 1985

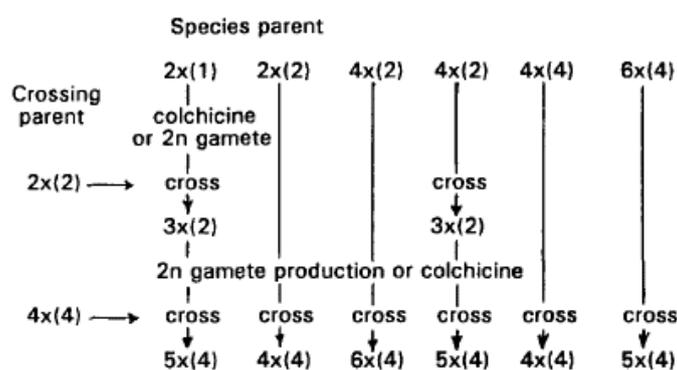


Figure I.11. Stratégie de croisements pour l'introduction de caractères issus d'espèces sauvages apparentées vers *S. tuberosum* (4x, 4EBN) selon le niveau de ploïdie et l'EBN de l'espèce (Ortiz & Ehlenfeldt, 1992)

vii. Le soja

Le genre *Glycine* est subdivisé en deux sous-genres *Glycine* et *Soja*. Le sous-genre *Soja* est composé de deux espèces : *Glycine max* (2n = 40), le soja cultivé, et *Glycine soja* (2n = 40) (Newell & Hymowitz, 1982). Les deux espèces sont inter-fertiles et des caractères intéressants liés à la tolérance au froid, au contenu protéique et au rendement peuvent facilement être transférés de *G. soja* vers *G. max* (Maxted & Kell, 2009). Le sous-genre *Glycine* comprend 26 espèces présentant des caractères d'intérêt pour la résistance à la rouille, aux nématodes à kystes, au virus de la mosaïque de la luzerne et à *Sclerotinia*, la tolérance au sel et à la sécheresse (Newell & Hymowitz, 1982 ; Singh & Nelson, 2015). Cependant, les croisements de ces espèces avec *G. max* sont très difficiles (Newell & Hymowitz, 1982 ; Singh & Nelson, 2015). *G. tomentella* (2n = 78 et 2n = 80) est la seule espèce à avoir été croisée avec *G. max* grâce au sauvetage d'embryon (Newell & Hymowitz, 1982). Mais les diverses tentatives ont produit des hybrides stériles jusqu'au début des années 1990 (Singh et al., 1990). Par la suite, Singh & Nelson (2015) ont réussi à obtenir des hybrides, par sauvetage d'embryon, de *G. max* avec trois espèces du sous-genre *Glycine*, *G. tomentella* (2n = 40 et 2n = 78), *G. argyrea* (2n = 40) et *G. latifolia* (2n = 40). Cette réussite d'hybridation est une première étape pour l'exploitation des caractères intéressants présents chez ces espèces.

viii. Le maïs

Le genre *Zea*, de la famille des Poacées, est composé de quatre espèces : *Zea mays*, *Z. diploperennis*, *Z. perennis* et *Z. luxurians* (Matsuoka *et al.*, 2002 ; Maxted & Kell, 2009). L'espèce *Z. mays* est elle-même subdivisée en trois sous-espèces : *Z. mays* ssp. *mays*, le maïs, *Z. mays* ssp. *Parviglumis* et *Z. mays* ssp. *Mexicana*. Les espèces et sous-espèces de *Zea* autres que le maïs cultivé sont des téosintes. Ces plantes peuvent être utilisées pour l'introduction de nouveaux caractères de résistance aux maladies ou d'aptitudes culturales chez le maïs (Tableau I.10). De même, quelques espèces du genre *Tripsacum* peuvent également être source de diversité. Cependant, les croisements de *T. dactyloides* avec *Z. mays* produisent des hybrides stériles. Il est donc nécessaire d'utiliser une espèce pont, *Z. diploperennis*, pour le transfert de caractères de *T. dactyloides* vers *Z. mays* (Prischmann *et al.*, 2009).

Tableau I.10. Exemples d'apports des espèces apparentées au maïs

Espèce apparentée	Caractères d'intérêt	Référence
<i>Zea diploperennis</i>	Résistance aux virus, amélioration du rendement, augmentation du tallage	Cohen & Galinat, 1984 ; Nault <i>et al.</i> , 1982 ; Sondahl <i>et al.</i> , 1984
<i>Zea perennis</i>	Résistance aux virus, amélioration du rendement	Cohen & Galinat, 1984 ; Nault <i>et al.</i> , 1982
<i>Tripsacum dactyloides</i>	Résistance à l'helminthosporiose, à la chrysomèle	Goodman <i>et al.</i> , 1987 ; Prischmann <i>et al.</i> , 2009

Comme nous l'avons vu et illustré dans cette partie à travers plusieurs exemples, les espèces sauvages apparentées ont longtemps été utilisées pour l'amélioration des espèces cultivées. Cependant, le nombre d'études portant sur l'utilisation d'espèces sauvages apparentées varie beaucoup en fonction de l'importance sociale et économique de l'espèce cultivée. De plus, la diversité génétique de l'espèce cultivée permet dans certains cas de couvrir les besoins des programmes d'amélioration sans avoir recours aux espèces apparentées. Enfin, même si les espèces sauvages apparentées présentent de nombreux caractères d'intérêt, les difficultés pour réussir les croisements interspécifiques peuvent, dans certains cas, entraver leur utilisation. C'est ce que nous allons voir dans le cas de l'amélioration de vigne avec *M. rotundifolia*.

3. *M. rotundifolia*, une espèce porteuse de nombreuses résistances aux maladies mais difficile à exploiter dans les programmes d'amélioration de la vigne cultivée

La quasi-totalité des variétés de *V. vinifera* ont une sensibilité plus ou moins grande aux maladies, et notamment au mildiou et à l'oïdium (Tableau I.2). Afin de créer de nouvelles variétés de vigne résistantes, il a donc été nécessaire de se tourner vers le compartiment des espèces sauvages apparentées pour rechercher et introduire des gènes de résistance dans la vigne cultivée. *M. rotundifolia* est probablement l'espèce apparentée la plus intéressante sur le plan de la résistance.

a. De multiples résistances

M. rotundifolia est une espèce résistante à de nombreux bioagresseurs de la vigne cultivée. Deux facteurs de résistance au mildiou, *Rpv1* et *Rpv2*, et trois facteurs de résistance à l'oïdium, *Run1*, *Run2* et *Ren5*, ont déjà été identifiés (Tableau I.3). Les gènes *Rpv1* et *Run1*, situés au même locus, ont pu être clonés et caractérisés comme appartenant à la famille de gènes de résistance TIR-NB-LRR

(Feechan *et al.*, 2013). Le niveau de résistance de *M. rotundifolia* au mildiou et à l'oïdium est considéré comme élevé, voire total, bien que, depuis les années 1960, des cas d'infection de *M. rotundifolia* par l'oïdium aient été constatés sur certaines variétés (Chen *et al.*, 2001). *M. rotundifolia* présente également un bon niveau de résistance au phylloxéra, aux nématodes *Meloidogyne arenaria* et *M. javanica*, ainsi qu'au nématode *Xiphinima index* vecteur du virus responsable de la maladie du court-noué chez *V. vinifera* (Bouquet, 1980 ; Chen *et al.*, 2001). Cependant, bien que *M. rotundifolia* soit très résistante à ces nématodes, c'est-à-dire qu'elle limite leur reproduction et permet ainsi de réduire la taille des populations de nématodes, *X. index* peut occasionnellement se nourrir sur les racines de *M. rotundifolia* et transmettre le virus du court-noué dont il est le vecteur (Oliver & Fuchs, 2011). De fait, l'infection au vignoble est plus lente en utilisant un porte-greffe résistant à *X. index* qu'avec un porte-greffe sensible (Chen *et al.*, 2001 ; Anonyme, 2010). *M. rotundifolia* est aussi tolérante, voire résistante, à la maladie de Pierce. En fonction des variétés, les dégâts causés par *X. fastidiosa* sont plus ou moins importants, mais restent inférieurs à ceux causés sur *V. vinifera* (Chen *et al.*, 2001).

Il est également à noter que *M. rotundifolia* présente une moindre sensibilité à l'eutypiose que *V. vinifera* (Chen *et al.*, 2001). De plus, cette espèce peut être infectée par le black-rot, mais contrairement à *V. vinifera*, les dégâts causés sur les baies sont légers. Seules les feuilles sont touchées et quelques rares baies lorsqu'elles sont jeunes (Chen *et al.*, 2001).

M. rotundifolia apparaît donc comme une source potentielle de résistance à de nombreux pathogènes. En effet, bien que cette espèce puisse être faiblement infectée par quelques maladies telles que le black-rot ou l'eutypiose, certaines accessions de *M. rotundifolia* présentent des niveaux de résistance suffisants pour être exploités dans les programmes de sélection pour l'amélioration de la vigne cultivée.

b. Des caractéristiques culturelles et organoleptiques inadaptées à la viticulture européenne

Malgré son niveau élevé de résistance à certaines maladies de la vigne, *M. rotundifolia* présente des défauts cultureux et organoleptiques limitant son utilisation directe pour créer des variétés destinées à la viticulture européenne.

i. Une espèce subtropicale

M. rotundifolia est une espèce subtropicale originaire du continent nord-américain. Son aire de répartition englobe tout le sud-est des États-Unis et notamment les régions bordant le Golfe du Mexique (Figure I.12).

M. rotundifolia est parfaitement adaptée au climat chaud et humide de ces régions (Olien, 2001). Il est donc fortement recommandé de ne pas cultiver cette plante dans les régions où la température peut descendre en dessous de -12°C, des dégâts importants pouvant survenir en dessous de cette température. Néanmoins, la tolérance de *M. rotundifolia* au froid varie en fonction de la vitesse à laquelle la température décroît, de l'âge du pied, de la variété et de l'état de la plante (Himelrick, 2001).

ii. Une espèce possédant un goût foxé

Parmi les trois espèces du sous-genre *Muscadinia*, *M. rotundifolia* est la seule à être cultivée pour l'alimentation humaine. Sa culture a commencé il y a plus de 400 ans et son fruit occupe une place importante dans les sociétés des régions où elle est présente (Olien & Hegwood, 1990). Les indiens d'Amérique consommaient le fruit de muscadine séché. Lors de leur arrivée, les colons espagnols ont produit du vin à partir de son jus. Ce marché du vin est le plus ancien et le plus développé commercialement. La baie de muscadine peut également être consommée entière ou transformée pour la préparation de gelées, de marmelades, de jus ou de tartes (Olien, 2001).

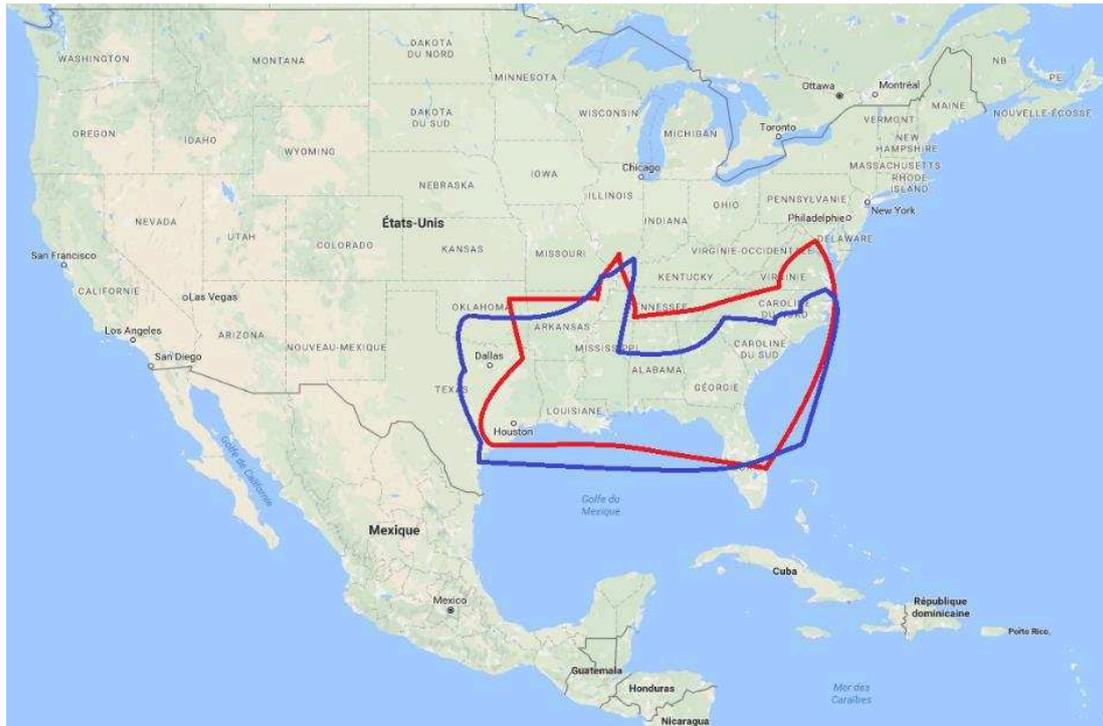


Figure I.12. Aires de répartition naturelle (en rouge) et de production (en bleu) de *M. rotundifolia* (d'après Olien, 2001)

Le fruit de *M. rotundifolia* est connu pour son goût particulier, très éloigné de celui de *V. vinifera*. Le jus est sucré et possède un arôme musqué, ou foxé, caractéristique des vignes américaines (Goffinet *et al.*, 2001). L'origine de ce goût particulier a été longuement étudié en ayant recours à des techniques de chromatographie en phase gazeuse, de spectrométrie de masse et d'olfactométrie (Baek *et al.*, 1997 ; Baek & Cadwallader, 1999 ; Lamikanra *et al.*, 1996 ; Lin, 2014). Plusieurs molécules ont ainsi été identifiées comme responsables du goût caractéristique de la muscadine : le 2,5-diméthyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (furaneol), l'*o*-aminoacetophenone et le 2-phénylethanol (Baek *et al.*, 1997 ; Baek & Cadwallader, 1999 ; Lamikanra *et al.*, 1996). Le furaneol a un arôme de marshmallow brûlé ou de sucre brûlé, l'*o*-aminoacetophenone a un arôme foxé, d'urine de chat, et le 2-phénylethanol a un arôme de rose, de plastique ou de styrène (Baek *et al.*, 1997). De nombreuses autres molécules ont été identifiées mais les résultats varient fortement selon les études, les variétés et le produit étudié, baie, jus ou vin.

La baie de muscadine est également connue pour ses qualités nutritionnelles, notamment pour sa composition en antioxydants (Ector, 2001). Etant donné l'intérêt grandissant des consommateurs pour ce type d'aliment, de nombreuses études portent sur la détermination et la quantification des composés phénoliques dans les baies de muscadine (Flamini *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2005 ; Pastrana-Bonilla *et al.*, 2003 ; Talcott & Lee, 2002). Les composés étudiés sont les anthocyanes, responsables de la couleur rouge de la pellicule et des vins, les stilbènes, des phytoalexines - molécules produites par la plante en réponse à une attaque de pathogène, les flavonoïdes, impliquées dans la photoprotection, et les ellagitannins, des dérivés de l'acide ellagique (Flamini *et al.*, 2013 ; Talcott & Lee, 2002). Ces composés sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticarcinogènes et leur effet sur la prévention des maladies cardiovasculaires (Flamini *et al.*, 2013).

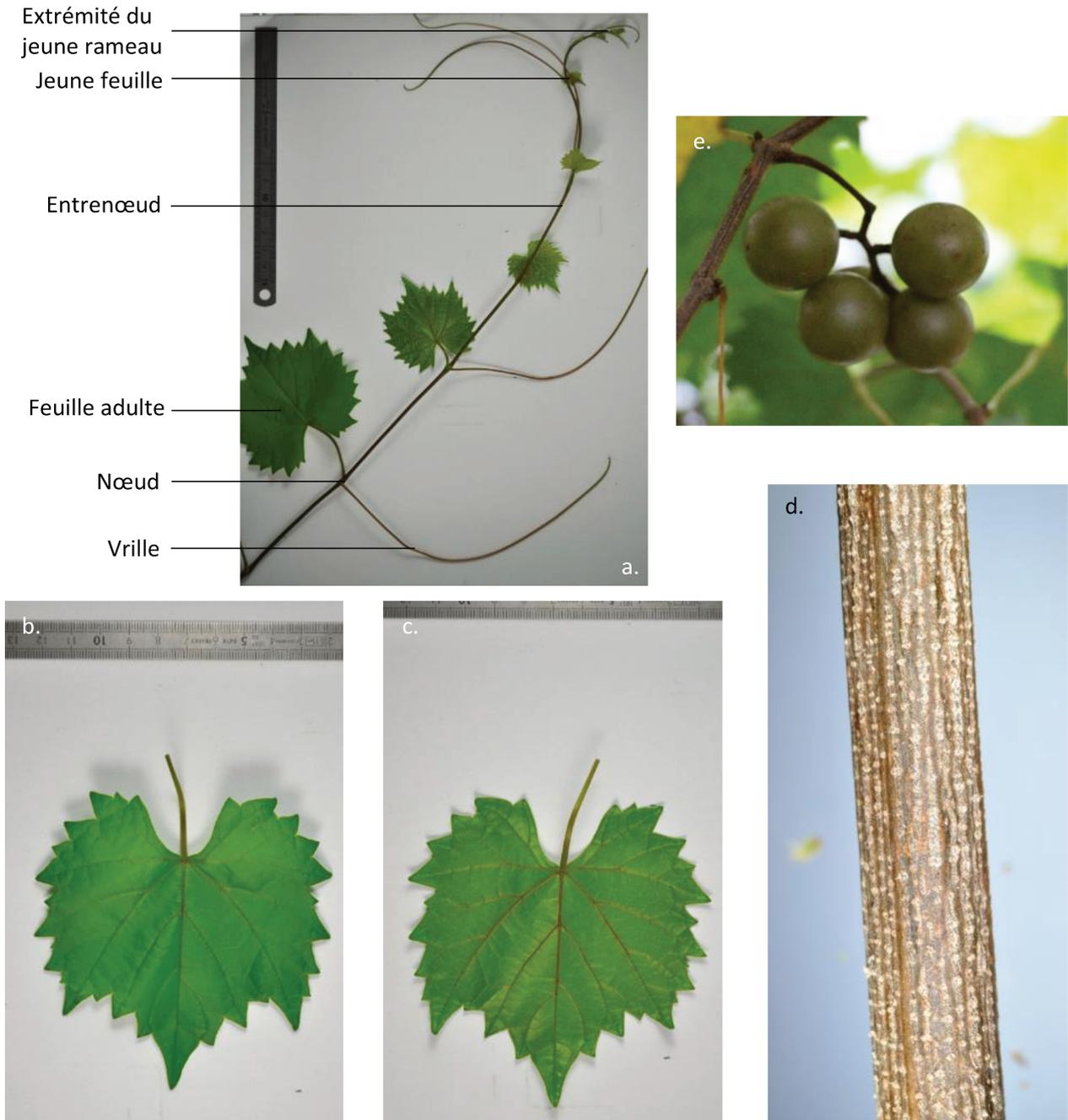


Figure I.13. Morphologie de la muscadine. a. Organisation du rameau principal. b. Face supérieure du limbe de la feuille adulte. c. Face inférieure du limbe de la feuille adulte. d. Sarment. e. Grappe

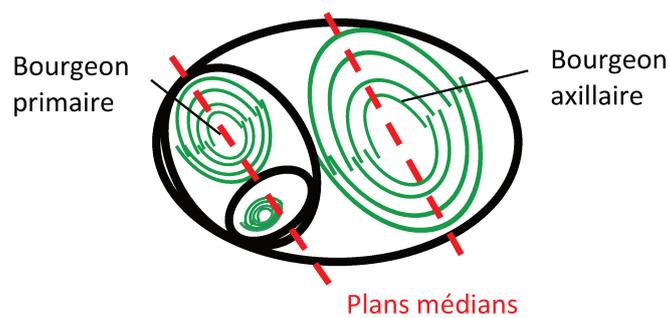


Figure I.14. Organisation du bourgeon chez *M. rotundifolia* (d'après Goffinet et al., 2001)

Malheureusement, les anthocyanes contenus dans les baies de muscadine s'oxydent rapidement, aboutissant à des défauts de saveur et de couleur dans les jus et dans les vins (Olien & Hegwood, 1990). Dans le cadre de l'amélioration variétale de la muscadine, des caractères issus d'autres espèces de *Vitis* sont introduits afin d'améliorer la stabilité des jus et des vins de muscadine, en modifiant le contenu anthocyanique des baies, ou d'augmenter le rendement en jus de la muscadine (Olien & Hegwood, 1990).

iii. Autres caractéristiques de *M. rotundifolia*

Tout comme *V. vinifera*, *M. rotundifolia* est une liane. Ainsi, sur le rameau, chaque feuille est opposée à une vrille selon le même rythme que *V. vinifera*, ce qui lui permet de s'accrocher à un support (Figure I.13a). Les feuilles de *M. rotundifolia* sont petites, plutôt rondes et de forme assez variable (Figure I.13b et Figure I.13c). Le limbe possède généralement un lobe, voire trois lobes avec des sinus latéraux peu prononcés. Le sinus pétiolaire est peu profond et ouvert. Le limbe est plus ou moins rigide, brillant sur le dessus et glabre sur le dessous avec parfois quelques poils sur les nervures. Le limbe inférieur des jeunes feuilles peut être légèrement poilu, surtout au niveau des nervures. Les bords de la feuille sont pourvus de grosses dents pointues, la nervure principale est terminée par une dent longue (Goffinet *et al.*, 2001). L'épiderme du sarment de *M. rotundifolia* présente de nombreuses lenticelles à sa surface (Figure I.13d), cinq nervures sont visibles au niveau des nœuds, pour alimenter les feuilles (Goffinet *et al.*, 2001). Dans le bourgeon de *M. rotundifolia*, le plan médian formé par les feuilles du bourgeon axillaire est parallèle au plan du bourgeon primaire (Figure I.14) (Goffinet *et al.*, 2001).

La formation des structures reproductives est similaire entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia* (Goffinet *et al.*, 2001). En revanche, *M. rotundifolia* est généralement dioïque du fait de la formation incomplète de ses étamines ou du pistil. Ainsi, 60 à 75 % des muscadines sont mâles (Olien, 2001). Cependant, les programmes de sélection ont permis d'obtenir des variétés hermaphrodites (Goffinet *et al.*, 2001). Les grappes de *M. rotundifolia* peuvent porter jusqu'à 40 raisins mais plus généralement n'en ont que de 4 à 10. La baie est charnue, de forme sphérique à ellipsoïdale et sa couleur varie, quand elle est mûre, du noir-violet au bronze (Figure I.13e). La chaire est ferme, plutôt visqueuse et facile à séparer de la peau qui est dure, élastique, tannée, astringente et parsemée de lenticelles (Goffinet *et al.*, 2001 ; Olien, 2001 ; Olien & Hegwood, 1990).

Quelques études ont cherché à comparer certains caractères de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* et des différences importantes ont été identifiées (Tableau I.11).

Tableau I.11. Principales différences identifiées entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera* (Bouquet, 1980 ; Olien, 2001 ; Olmo, 1986 ; Patel & Olmo, 1955)

Caractères	<i>V. vinifera</i>	<i>M. rotundifolia</i>
Vrilles	Fourchues	Simple
Lenticelles	Absentes	Présentes
Écorce	Bois jeune : striée, bois vieux : épaisse et rugueuse, desquame en bandes	Bois jeune : fine, lisse, adhérente, bois vieux : desquame en écailles
Densité du bois	< 1	> 1
Moelle	Discontinue (diaphragme au nœud)	Continue
Phellogène	Profond	Sous-épidermique
Fibres du phloème	Tangentielles	Radiales
Taille de la grappe	Grosse	Petite
Zone d'abscission entre le fruit et le rachis	Absente	Présente
Qualités organoleptiques	Bonnes	Faibles
Graines	Ovoïdes, chalaze lisse	Oblongues, chalaze ridée
Bouture	Sur bois	En vert

M. rotundifolia possède plusieurs caractères inadaptés à la viticulture européenne. Ces caractères portent à la fois sur les qualités culturales (sensibilité au froid, rendement, inaptitude au bouturage) et organoleptiques (goût foxé, manque de stabilité des jus et des vins). De précédentes études ont également identifié d'autres caractères différenciant *M. rotundifolia* de *V. vinifera*, n'intervenant pas sur les aptitudes culturales ou sur le goût mais sur l'apparence de la plante.

c. Des croisements interspécifiques difficiles

Pour utiliser les résistances présentes chez *M. rotundifolia*, de nombreux sélectionneurs ont tenté de croiser cette espèce avec *V. vinifera*. Cependant, les résultats n'ont pas toujours été concluants.

i. Un taux de réussite des croisements interspécifiques bas

L'intérêt de *M. rotundifolia* pour répondre aux attaques du phylloxéra, du mildiou et de l'oïdium a rapidement été reconnu. En 1868, Van Buren a été le premier à essayer de croiser *V. vinifera* avec *M. rotundifolia* et n'a malheureusement pas réussi (Detjen, 1919). D'autres tentatives d'hybridation ont été réalisées par Wylie en 1871 et par Millardet en 1882, mais elles n'ont abouti qu'à la formation de faux hybrides, résultant de l'autofécondation de l'une ou l'autre espèce. Munson en 1909, Reimer et Detjen en 1914 et Dearing en 1917 sont parvenu au même résultat (Galet, 1988).

Finalement, en 1919, Detjen réussit à obtenir de nombreux hybrides grâce au croisement *V. vinifera* cv. Malaga x *M. rotundifolia*. En revanche, malgré de multiples essais, le croisement réciproque ne produit que deux hybrides. Il en conclut alors que le croisement entre les deux espèces est difficile mais pas impossible, la réussite dépendant du sens du croisement et de la variété utilisée. Les résultats du croisement *V. vinifera* x *M. rotundifolia* sont très variables en fonction des années et dépendent du parent femelle utilisé (Bouquet, 1980 ; Patel & Olmo, 1955). D'autre part, le pourcentage de germination des hybrides est similaire à celui du parent femelle mais les individus obtenus sont peu vigoureux. Ceci limite leurs chances d'atteindre le stade reproducteur (Patel & Olmo, 1955). En 1989, Goldy *et al.* parviennent à améliorer la productivité des croisements en réalisant un sauvetage d'embryons six semaines après la pollinisation ou à véraison.

En 1955, Patel & Olmo étudient la croissance du tube pollinique d'un grain de pollen de *V. vinifera* dans le pistil de *M. rotundifolia*. Lors de cette étude, la germination du grain de pollen est normale et le tube pollinique pénètre dans le style, voire dans l'ovule, sans que la fécondation n'ait lieu. Ce résultat semble indiquer que l'incompatibilité survient juste avant la fécondation. Pour compléter cette étude, Lu & Lamikanra (1996) utilisent la microscopie par fluorescence pour étudier la croissance du tube pollinique dans le style. Lors d'une autofécondation de *M. rotundifolia*, le tube pollinique atteint la base du pistil en 8h. Lors du croisement *V. vinifera* x *M. rotundifolia*, il l'atteint en un délai allant de 8h à 24h. Lors du croisement réciproque, la plupart des tubes polliniques s'arrêtent avant d'avoir atteint la base du pistil. Ils en concluent que, dans leur étude, la cause de l'échec du croisement semble être l'avortement du tube pollinique. Il existe donc au moins deux barrières en fonction des génotypes utilisés : dans le style et dans le sac embryonnaire. Le sauvetage d'embryon ne peut pas être utilisé dans ce cas puisque la fécondation n'a pas lieu.

ii. Une stérilité élevée des hybrides F1

Les hybrides F1 obtenus des croisements entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia* ont un phénotype très homogène, notamment au niveau des caractères végétatifs (Jelonkovic & Olmo, 1968 ; Patel & Olmo, 1955). Ils présentent beaucoup de caractères de *M. rotundifolia* : feuille brillante, écorce adhérent au tronc, densité du bois supérieure à 1, absence de striation de la tige, présence de lenticelles, absence de diaphragme au nœud, moelle verte, peau de la baie fine, pulpe mucilagineuse, arôme musqué et forme de la graine (Jelonkovic & Olmo, 1968). En revanche, la découpe des feuilles, l'apparence des inflorescences et la saveur du jus sont celles de *V. vinifera* (Patel & Olmo, 1955).

Certains caractères s'expriment de façon intermédiaire entre les deux parents : le diamètre de la tige, les vrilles, la taille des inflorescences, la taille des feuilles, la présence du sinus supérieur mais pas du sinus inférieur (Jelonkovic & Olmo, 1968).

Le problème majeur se pose au niveau de la fertilité des hybrides. En effet, 70 % des hybrides F1 pollinisés ne produisent pas de fruits et peuvent être considérés comme complètement stériles (Bouquet, 1980). De plus, les hybrides produisent peu de pollen et 80 à 95 % du pollen n'est pas viable et ne germe pas (Jelonkovic & Olmo, 1968 ; Patel & Olmo, 1955 ; Viljoen & Spies, 1995). La fertilité des hybrides est également dépendante de leur parent maternel. De plus, Jelonkovic & Olmo (1968) constatent que la pollinisation des hybrides donne de meilleurs résultats avec *V. vinifera* qu'avec *M. rotundifolia* comme parent mâle. La majorité des fruits produits contient au moins une graine mais le pourcentage de graines viables est fortement variable. Le croisement réciproque donne peu de baies et ces dernières ne contiennent pas plus d'une graine par fruit.

Les problèmes de stérilité des hybrides sont généralement attribués à la différence de nombre chromosomique entre les deux espèces. En effet, *V. vinifera* possède $2n = 38$ chromosomes tandis que *M. rotundifolia* a $2n = 40$ chromosomes. Des études cytogénétiques ont prouvé que les hybrides possèdent 39 chromosomes (Patel & Olmo, 1955). Cependant, les différentes études se contredisent quant à la corrélation entre appariement des chromosomes en méiose et stérilité des hybrides. En effet, Jelonkovic & Olmo (1968) observent une forte corrélation entre l'appariement des chromosomes en méiose et la fertilité des hybrides, alors que Bouquet (1980) n'identifie pas de corrélation. Selon ce dernier, la stérilité serait d'ordre chromosomique et génétique. En 1964, Dermen découvre qu'il est possible de restaurer la fertilité des hybrides par doublement chromosomique (78 chromosomes au lieu de 39). À l'inverse, le doublement du nombre de chromosome des parents ne facilite pas le croisement.

iii. Une fertilité partiellement restaurée dans la descendance

Jelonkovic & Olmo (1969) réussissent à produire des individus de backcross 1 (BC1) par pollinisation libre des hybrides F1 par *V. vinifera*. La variabilité des caractères est plus grande dans la population de BC1 que dans la population F1. La majorité des caractères morphologiques du tronc, de la tige, des grappes et des feuilles sont de type *V. vinifera*. Le caractère densité du bois est de type *M. rotundifolia*. Et les caractères des baies et des graines sont variables. La fertilité des ovules des BC1 est moyenne : 10,2 à 46,1 % des fleurs produisent des fruits avec 1 à 1,4 graines par fruit.

Dans d'autres travaux, il a été constaté que les barrières spécifiques s'affaiblissent au fur et à mesure des backcross successifs (Galet, 1988) : les croisements sont de plus en plus faciles, produisent plus d'individus et ces derniers sont plus fertiles.

Comme nous avons pu le voir dans cette partie, *M. rotundifolia* apparaît comme une espèce hautement intéressante du fait de son haut niveau de résistance au mildiou et à l'oïdium, mais également à d'autres maladies. Malheureusement, ses défauts culturaux et organoleptiques ainsi que des problèmes survenant lors des croisements interspécifiques limitent son utilisation dans les programmes de création variétale.

4. Contexte, objectifs et démarche de la thèse

a. Contexte de la création variétale en France : le pyramidage pour la gestion durable des résistances

Suite à la crise engendrée par l'utilisation des hybrides producteurs directs en France, le développement de variétés porteuses de résistances s'est peu répandu au vignoble malgré le nombre

élevé de facteurs de résistance mis en évidence, notamment en raison de la faible qualité organoleptique des hybrides. Comme expliqué précédemment, l'introggression permet de limiter la présence, dans les variétés cultivées provenant de croisements interspécifiques, de caractères indésirables issus de l'espèce sauvage apparentée grâce à l'élimination progressive de son génome lors de croisements retours. Suite aux travaux sur *M. rotundifolia* d'Alain Bouquet à Montpellier, des variétés porteuses des facteurs *Rpv1* et *Run1* ont été créées. Cependant, ces variétés posent problème du fait de leur source de résistance unique qui peut être facilement contournée (Bouquet, 2009 ; Merdinoglu & Caranta, 2013). Pour limiter les risques de contournement, des cépages présentant des faibles niveaux de sensibilité au mildiou et à l'oïdium ont été utilisés lors des backcross (Bouquet, 2009). Néanmoins, le risque de contournement de la résistance par les pathogènes est d'autant plus préoccupant que, la vigne étant une culture pérenne, les parcelles plantées avec des variétés résistantes sont appelées à rester en place plusieurs décennies. Les pathogènes de types bactériens, viraux ou fongiques ont quant à eux une forte capacité d'adaptation. Le développement de résistance aux pesticides n'est pas rare et, pour limiter ce phénomène, quelques précautions sont nécessaires à mettre en place. Par exemple, les fabricants de produits phytosanitaires recommandent aux agriculteurs d'alterner les principes actifs utilisés d'une année sur l'autre. Dans le cadre de la création et de l'implantation de variétés résistantes, le phénomène de contournement de résistance par les pathogènes est tout aussi important. Ainsi, la résistance au mildiou conférée par *Rpv3*, présente notamment dans les cépages Bianca et Regent, ainsi que la résistance à l'oïdium conférée par *Run1* ont été contournées dans plusieurs vignobles (Feechan *et al.*, 2015 ; Peressotti *et al.*, 2010).

L'enjeu majeur en viticulture est donc de développer des cépages à résistance durable étant donnée la longévité des parcelles viticoles. Pour augmenter la durabilité d'une résistance, il est nécessaire de maîtriser la pression de sélection exercée par cette résistance sur le pathogène (Merdinoglu & Caranta, 2013). Plus la pression de sélection est importante, plus les risques de contournement de la résistance sont grands. Ainsi, une résistance monogénique, conférée par un gène majeur, est plus facilement contournée par le pathogène. L'association d'une résistance monogénique à un fond génétique résistant, c'est-à-dire contenant plusieurs facteurs quantitatifs à effet partiels (*Quantitative Trait Loci*, QTL), augmente la durabilité de cette résistance (Brun *et al.*, 2010 ; Palloix *et al.*, 2009 ; Quenouille *et al.*, 2013). Cette meilleure durabilité des facteurs quantitatifs est le résultat de trois mécanismes : la résistance additionnelle procurée par ces facteurs, le plus grand nombre de résistances nécessaires pour le contournement de la résistance par le pathogène et la moindre pression de sélection exercée (Quenouille *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'accumulation de plusieurs facteurs de résistance combinant des modes d'action variés, agissant à différentes étapes du cycle infectieux est préférable (Merdinoglu & Caranta, 2013).

Les programmes de sélection de l'Inra s'appuient aujourd'hui sur le pyramidage pour améliorer la durabilité des résistances. Le pyramidage consiste à combiner dans un même cépage plusieurs facteurs de résistance issus de sources différentes (*Vitis* européens, américains, asiatiques et *M. rotundifolia*). Les variétés développées possèdent différentes combinaisons de quatre à six facteurs de résistance : *Rpv1*, *Rpv3* et *Rpv10*, conférant la résistance au mildiou, et *Run1*, *Ren3* et *Ren3.2* (Merdinoglu *et al.*, en préparation). Quatre variétés ont été soumises pour inscription au catalogue en 2017, pour un total de 30 variétés prévues entre 2017 et 2024 (Merdinoglu *et al.*, en préparation).

b. Contexte et objectifs de la thèse

La recherche systématique de résistance dans les espèces apparentées à *V. vinifera* a été réalisée ces dernières années, permettant l'identification en tout d'une vingtaine de facteurs de résistance au mildiou et à l'oïdium. Dans ce contexte, *M. rotundifolia* est une espèce hautement intéressante du fait de sa résistance à de nombreux ravageurs et maladies. Cependant, les programmes de sélection ayant principalement recours à l'hybridation pour le développement des nouvelles

variétés, les difficultés à obtenir des hybrides interspécifiques avec *V. vinifera* et à en produire des descendances entravent l'utilisation de *M. rotundifolia*.

M. rotundifolia possède, par ailleurs, un certain nombre de défauts culturaux et organoleptiques, telles que la sensibilité au froid ou le goût foxé, qu'il est nécessaire d'éliminer lors du processus d'introgression. De plus, suite aux défauts de goût et aux problèmes sanitaires engendrés par les hybrides producteurs directs, les hybrides interspécifiques ont une mauvaise image dans la profession viticole et les caractères prouvant une origine autre que *V. vinifera* sont traqués dans les nouvelles variétés.

L'objectif de la thèse est donc double. D'une part, il s'agit d'identifier les causes, notamment sur les plans génétique et génomique, qui rendent les croisements entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera* difficiles et donc limitent le transfert des caractères entre les deux espèces. D'autre part, afin de rendre les nouvelles variétés acceptables vis-à-vis des viticulteurs, il est nécessaire d'identifier les caractères phénotypiques spécifiques à *M. rotundifolia*, qu'ils soient impliqués ou non dans les défauts culturaux et organoleptiques de la muscadine. La compréhension de leur déterminisme génétique permettra de gérer au mieux leur potentielle élimination au cours du processus d'introgression des facteurs de résistance.

c. Démarche

L'objectif double de la thèse repose sur deux approches (Figure I.15). D'une part, l'analyse génétique et génomique de différents niveaux de pseudo-backcross a pour but d'identifier les singularités de la recombinaison méiotique entre les génomes des deux espèces et de localiser des régions chromosomiques ayant un impact sur la survie des descendants. D'autre part, la comparaison au niveau phénotypique des deux espèces a pour objectif l'identification de caractères spécifiques de *M. rotundifolia*. L'étude de la transmission de ces caractères dans différentes populations de pseudo-backcross permet d'établir leur déterminisme génétique. Pour cela, plusieurs populations de plantes sont utilisées. D'une part, deux populations constituées d'accessions de *V. vinifera* et de *M. rotundifolia*

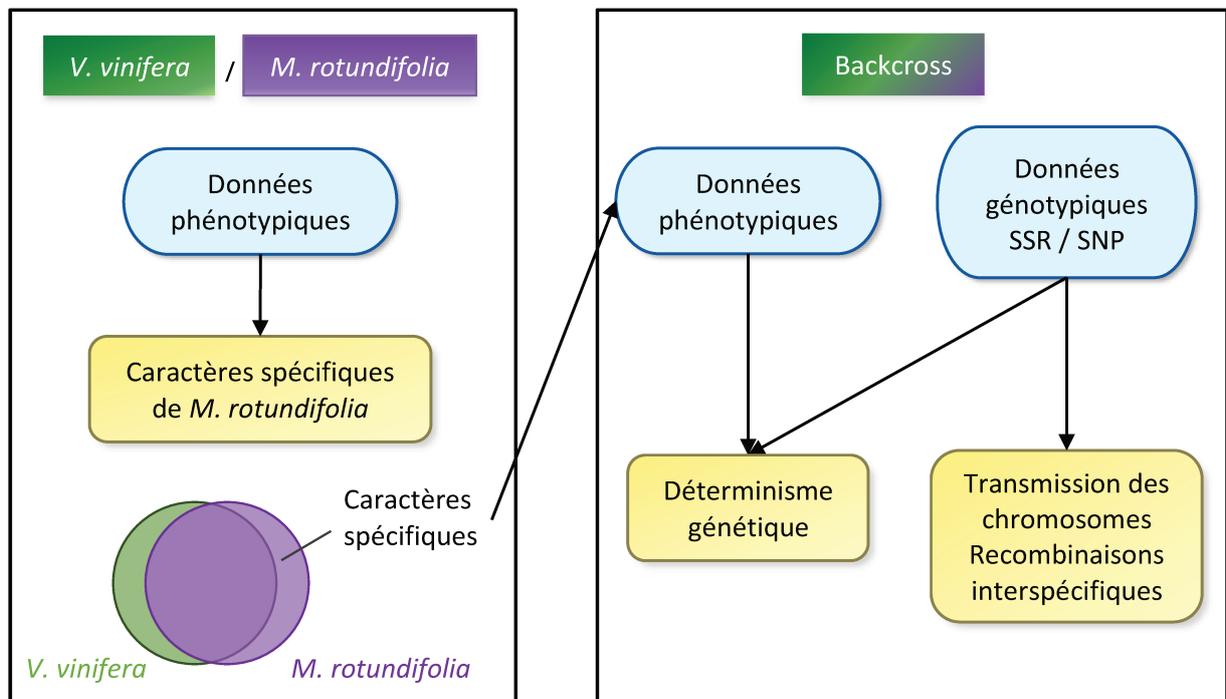


Figure I.15. Démarche générale de la thèse

représentent la diversité phénotypique et génétique disponible au sein de chaque espèce. D'autre part, trois populations ont été générées à partir de différents niveaux de pseudo-backcross entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia* : deux populations, de BC1 et de BC4, issues de l'introgression d'une même accession de muscadine, et une population de BC2 issue d'une autre accession de muscadine. L'enjeu final de ces travaux est d'apporter les connaissances permettant de développer de nouveaux outils de sélection afin d'optimiser le processus d'introgression des facteurs de résistance issus de *M. rotundifolia*. Plus globalement, ils visent à explorer l'impact, sur les échanges chromosomiques au cours de la méiose, de la coexistence de génomes homéologues au sein d'une même cellule.

De nombreux facteurs influencent le taux de recombinaison tels que les caractéristiques épigénétiques ou la composition de l'ADN. Il n'est donc pas surprenant de constater que le taux de recombinaison peut varier d'une espèce à l'autre (Smukowski & Noor, 2011). Sachant cela, observer l'évolution du taux de recombinaison dans des hybrides interspécifiques et des backcross apparaît nécessaire. Plusieurs études ont montré que les taux de recombinaison pouvaient être faibles dans des régions très différenciées, comme les centromères ou lors de croisements interspécifiques, aboutissant à des cartes contractées dans ces régions (Hill *et al.*, 2015 ; King *et al.*, 2017 ; Noor & Bennett, 2009). Une suppression complète des recombinaisons interspécifiques peut même être observée dans les régions ayant subi une inversion chromosomique (Kulathinal *et al.*, 2009).

Les cartes génétiques à haute densité sont un outil puissant pour étudier la variation des taux de recombinaison le long du génome. Cependant, elles nécessitent le développement d'un nombre élevé de marqueurs génétiques. Les nouvelles méthodes de séquençage développées ces dernières années permettent d'acquérir des données de reséquençage de génomes entiers, de manière plus efficace et moins coûteuse que les précédentes techniques (Varshney *et al.*, 2009). L'utilisation de ces technologies de dernière génération a permis de créer une puce à ADN chez la vigne (Myles *et al.*, 2010). Cette puce, contenant 9 000 SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), a été développée à partir de dix cépages de *V. vinifera* et de six accessions de *Vitis*, dont la variété 'Noble' de *M. rotundifolia*. Sa

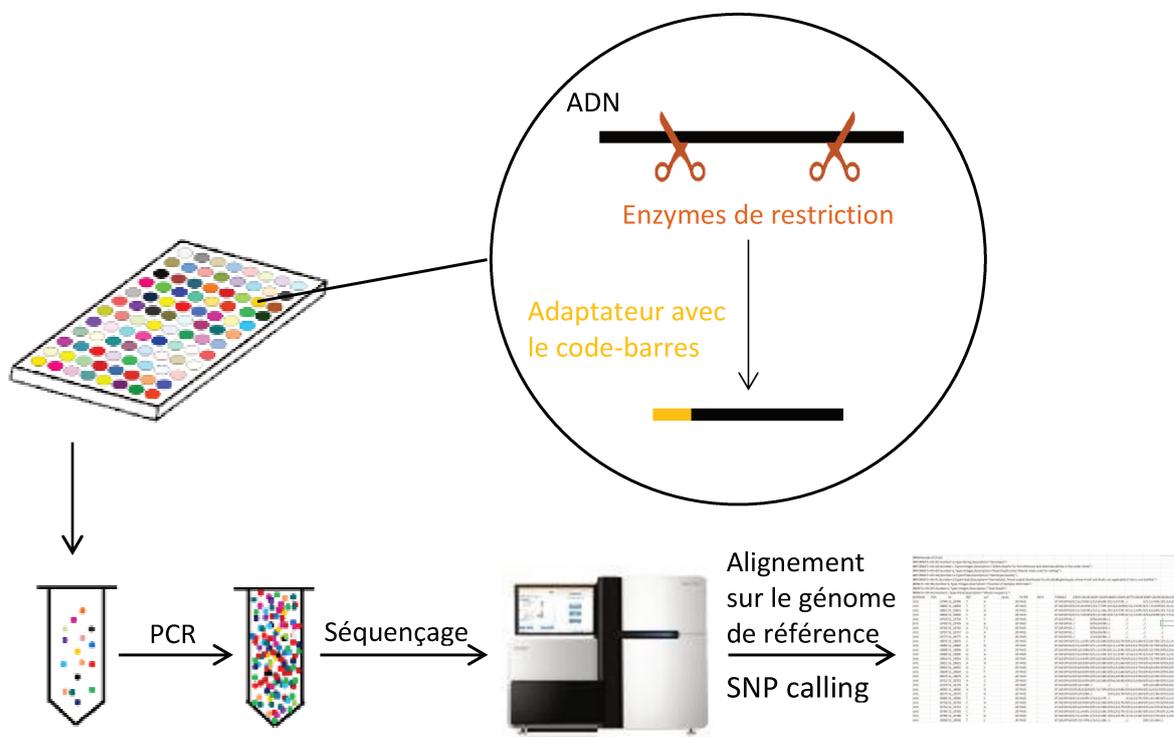


Figure I.16. Principe du GBS (d'après Elshire *et al.*, 2011)

résolution permet une bonne distinction des différentes espèces et des différents cépages (Myles *et al.*, 2010). Le génotypage-par-séquençage (GBS), une technique développée plus récemment à l'université de Cornell (USA), permet d'acquérir des données de polymorphisme de type SNP sur de nombreux individus en simultané à moindre coût (Elshire *et al.*, 2011). Cette méthode consiste à réduire la complexité du génome grâce à la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (Figure I.16). Les fragments d'ADN ainsi créés sont ensuite liés à des adaptateurs contenant un code-barres (séquence nucléotidique) spécifique pour chaque individu étudié. Les fragments d'ADN de tous les individus, et leurs codes-barres, sont ensuite poolés et amplifiés par PCR avant d'être séquencés par la technique Illumina. Pour chaque individu, les données de séquençage sont alignées sur un génome de référence pour une détection des SNP. Cette technique permet d'obtenir pour un coût modeste des données de SNP sur l'ensemble du génome sans *a priori*. Contrairement à la puce SNP où le set de SNP a déjà été établi sur un échantillon d'individus, le GBS permet de sélectionner de nouveaux SNP plus adaptés aux génotypes et aux populations étudiés.

C'est pour toutes ses caractéristiques, que nous avons choisi d'utiliser la technique de GBS pour étudier l'évolution des taux de recombinaison le long du génome dans différents niveaux de backcross entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, localiser les régions chromosomiques impliquées dans la survie de ces backcross et identifier le déterminisme génétique des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* à une échelle très fine.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Dans cette étude, trois groupes de plantes ont été étudiés : des accessions de *V. vinifera*, des accessions de *M. rotundifolia* et différents niveaux de pseudo-backcross (Figure I.15). Les accessions de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* ont été utilisées pour comparer la diversité phénologique, morphologique et métabolique des deux espèces. Les populations de pseudo-backcross ont été utilisées pour étudier les recombinaisons interspécifiques, la transmission des régions issues de *M. rotundifolia* et le déterminisme génétique des caractères spécifiques de *M. rotundifolia*.

a. Accessions de *V. vinifera* et de *M. rotundifolia*

Les accessions étudiées ont été choisies de façon à maximiser la diversité observée au sein de chaque espèce. De plus, afin d'identifier des caractères à forte héritabilité, une partie des plantes a été observée en serre et l'autre à l'extérieur.

Le groupe *V. vinifera* était composé de 36 accessions, dont 21 plantes en serre, 12 au vignoble et 3 à la fois en serre et au vignoble. Les 15 accessions étudiées au vignoble appartenaient à une collection ampélographique de 204 variétés reflétant la diversité phénotypique de *V. vinifera*. Le choix des accessions a été réalisé en s'appuyant sur leur origine géographique (est, centre, ouest) et sur leur utilisation (cuve ou table). Les 24 accessions étudiées en serre faisaient partie d'une Core collection composée de 279 variétés reflétant la diversité génétique de *V. vinifera* (Nicolas *et al.*, 2016). Le choix des accessions a été réalisé à l'aide de l'arbre phylogénétique dressé par Bacilieri *et al.* (2013). Cet arbre permet de définir cinq groupes génétiquement différents reprenant de façon plus fine le découpage géographique habituel : 1. Cuve et Table, Péninsule ibérique et Maghreb, 2. Table, Orient, 3. Cuve, Europe centrale et occidentale, 4. Italie et Europe centrale, 5. Cuve, Balkans et Europe occidentale.

Le groupe *M. rotundifolia* était composé de 24 accessions, dont 19 étaient cultivées en serre et 5 à l'extérieur. *M. rotundifolia* étant sensible au froid, ces 5 accessions ont été conservées en serre jusqu'à la floraison puis placées à l'extérieur.

Tous les organes ont été étudiés sur les accessions de *V. vinifera* et de *M. rotundifolia* cultivées au vignoble ou à l'extérieur. En revanche, plusieurs accessions en serre n'étant pas fertiles, les organes végétatifs et les organes reproducteurs n'ont pas été observés sur les mêmes groupes de plantes (Tableau II.1).

b. Populations de backcross

Trois populations de différents niveaux de pseudo-backcross ont été étudiées. Une population de pseudo-backcross 1 composée de 68 individus a été obtenue à partir du croisement entre 8624 ((*V. vinifera* cv. Carignan x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) x *M. rotundifolia* cv. Trayshed) et *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Une population de pseudo-backcross 4 composée de 79 individus a été obtenue à partir de la population de pseudo-backcross 1 à l'aide de trois pseudo-backcross avec différentes accessions de *V. vinifera*, respectivement Barbera, Tempranillo et Nebbiolo. Enfin, une population de pseudo-backcross 2 composée de 248 individus a été obtenue à partir du croisement entre 22-8-78 ((*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon x *V. vinifera* cv. Alicante Bouschet) x *M. rotundifolia* cv. NC184-4) x ((*V. vinifera* cv. Mourvèdre x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) x *V. vinifera* cv. Pinot meunier)) et *V. vinifera* cv. Syrah. Dans l'objectif de simplifier la lecture, les populations de pseudo-backcross seront appelées BC dans la suite du manuscrit. La population de BC1 a été cultivée à la fois au vignoble et en serre, celle de BC4 a été cultivée en serre et celle de BC2 au vignoble.

Tableau II.1. Organes étudiés sur les accessions de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* dans les différentes conditions

Accession	Feuilles, rameaux, bourgeons		Fleurs, baies	
	Serre	Vignoble / Extérieur	Serre	Vignoble / Extérieur
<i>V. vinifera</i>				
Verdelho tinto femelle	x			
Médouar	x			
Alba imputotato	x			
Rosa menna di Vacca	x			
Dureza	x			
Pozsony feher	x			
Vidiano	x			
Danugue	x			
Frankenthal rouge foncé	x			
Dimrit	x			
Riminèse	x			
Kövidinka	x		x	
Terret Bouschet	x		x	
Chaouch blanc	x		x	
Sultanine	x	x		x
Muscat d'Alexandrie	x	x		x
Carignan	x	x	x	x
Barbera		x		x
Cabernet Sauvignon		x		x
Nebbiolo		x		x
Grenache		x		x
Karadjidji		x		x
Kremovöi		x		x
Pinot gris		x		x
Sourhak		x		x
Syrah		x		x
Tempranillo		x		x
Trollinger		x		x
Ranii		x		x
Beregi rozsas			x	
Tibouren			x	
Alexandroouli			x	
Urmi dinka			x	
Tavkveri			x	
Kaisermuskat			x	
Mireille			x (sauf métabolisme)	
<i>M. rotundifolia</i>				
Dulcet		x		x
Carlos		x	x	x
YugaxCarlos		x		x
Regale		x	x	x
Unnamed		x		x
Unnamed 1	x			
Unnamed 2	x			
Unnamed 3	x			
Unnamed 4	x			
Unnamed 5	x			
Unnamed 6	x			
Unnamed 7	x			
Unnamed 8	x			
Unnamed 9	x			
Unnamed 10	x			
Unnamed 11	x			
Unnamed 12	x			
Unnamed 13	x			
Unnamed 14	x			
Unnamed 15	x			
Unnamed 16	x			
Unnamed 17	x			
Unnamed 18	x			
Unnamed 19	x			

2. Méthodes

a. Etude génétique

i. Génotypage-par-séquençage

L'ADN des populations de backcross a été extrait à partir de jeunes feuilles grâce au kit d'extraction Qiagen DNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). Les ADN de bonne qualité (concentration entre 50 et 200 ng/μL, non dégradé et digestible par EcoRI) ont été envoyés au service Genomic diversity facility à l'Institut de Biotechnologie de l'Université de Cornell (Ithaca, NY, USA) pour les analyses GBS. L'alignement sur le génome de référence de *V. vinifera* (PN40024 12Xv2) ainsi que le SNP calling ont également été réalisés à l'Université de Cornell selon le protocole décrit par Glaubitz *et al.* (2014) et dans la documentation du logiciel TASSEL 3.0. Les données SNP ont ensuite été nettoyées selon leur qualité : DP (read depth) ≥ 4, AD (allelic depth) ≥ 2. Chaque valeur de génotype obtenue ne respectant pas ces paramètres a été considérée comme donnée manquante.

ii. Cartographie génétique

Les marqueurs SNP ont été filtrés pour ne conserver que les plus fiables et les plus informatifs de chaque population. Ainsi, un marqueur était éliminé s'il avait :

- plus de 5 % de données manquantes dans la population,
- une ségrégation identique à celle d'un autre marqueur, soit une position génétique identique,
- l'origine de sa ségrégation inconnue en raison de l'absence de données sur les deux parents,
- pas de ségrégation dans la population du fait de l'homozygotie des deux parents.

De plus, pour chaque marqueur SNP conservé, l'ajustement de la distribution observée par rapport à la distribution mendélienne théorique a été testé à l'aide d'un test de χ^2 . En cas de distorsion dans la distribution (p-value < 0,05), le marqueur n'a pas été utilisé pour la cartographie. L'ensemble de ces filtres a également été appliqué aux marqueurs microsatellites.

Les cartes génétiques parentales ont été générées pour chaque population. La répartition des marqueurs dans les groupes de liaison a été réalisée à l'aide du logiciel JoinMap 3.0 (van Ooijen and Voorrips, 2001). Le calcul des liaisons entre marqueurs a été exécuté avec le package R/qtl du logiciel R (version 3.3.2, © 2016 The R Foundation for Statistical Computing) (Broman *et al.*, 2003).

Un taux de couverture a été évalué pour chaque carte, en utilisant la position des marqueurs les plus extrêmes sur chaque chromosome. Un taux de contraction a été calculé selon la formule :

$$C = \frac{Dg}{Dp} \times 300\,000$$

avec : - Dg : la distance génétique en cM entre les deux marqueurs extrêmes,

- Dp : la distance physique en bp entre ces deux marqueurs,

- 300 000 : une constante de conversion, permettant d'établir un taux moyen de contraction à 0,9.

iii. Chromosome painting

L'objectif du chromosome painting est d'identifier les régions issues de *M. rotundifolia* dans les individus de BC à l'aide de SNP spécifiques. Pour déterminer les SNP issus de *M. rotundifolia* dans les BC, les données de reséquençage de sept accessions de *M. rotundifolia* (Trayshed, Fry, Carlos, Dulcet, Regale, Yuga x Carlos et Michaux) étaient disponibles. Trayshed étant l'accession de *M. rotundifolia* utilisée pour générer les populations de BC1 et BC4, le chromosome painting a été réalisé à partir des données de reséquençage de cette accession. En revanche, le parent muscadine de la population de BC2 étant inconnu, les données des sept accessions ont été utilisées.

Dans un premier temps, les SNP issus de *M. rotundifolia* pouvant être présents dans les BC ont été déterminés (Figure II.1). Pour cela, les reads Illumina des sept accessions de *M. rotundifolia* ont été

alignés contre le génome de référence de *V. vinifera* (PN40024 12Xv2), à l'aide du logiciel d'alignement gsnap (Genomic Short-read Nucleotide Alignment Program) (Wu & Nacu, 2010). L'analyse a été réalisée avec les paramètres suivants : batch = 4, npaths = 3, max-mismatches = 12, Edit Distance = 15. Seuls les alignements appariés et présentant une localisation unique sur le génome de référence ont été conservés. La détection des SNP a ensuite été réalisée sur ces données en utilisant la suite de programmes Samtools et BCFtools (Li *et al.*, 2009 ; <http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>), avec les paramètres suivants : multiallelic-caller, skip-variants = Indel, pval-threshold = 1. La détection des SNP a été réalisée aux mêmes positions que celles des données GBS filtrées. Les données ont ensuite été nettoyées selon leur qualité : $QUAL \geq 30$, $4 \leq DP \leq 25$. Les données ne respectant pas ces seuils ont été considérées comme manquantes. Pour chaque population, le pool de SNP issus de *M. rotundifolia* (SNP muscadine) a été établi en ne conservant que les positions pour lesquelles au moins un allèle alternatif était détecté chez Trayshed, pour les populations de BC1 et BC4, ou chez l'une des sept accessions, pour la population de BC2.

Dans un second temps, pour chaque individu, les SNP muscadine identifiés ont été recherchés. À ces positions, pour être détecté comme issu de *M. rotundifolia*, le SNP muscadine devait être présent et à l'état hétérozygote. Le taux de SNP issus de *M. rotundifolia* (τ_i) a ensuite été calculé sur des fenêtres glissantes de 20 SNP, avec un pas de 1 SNP.

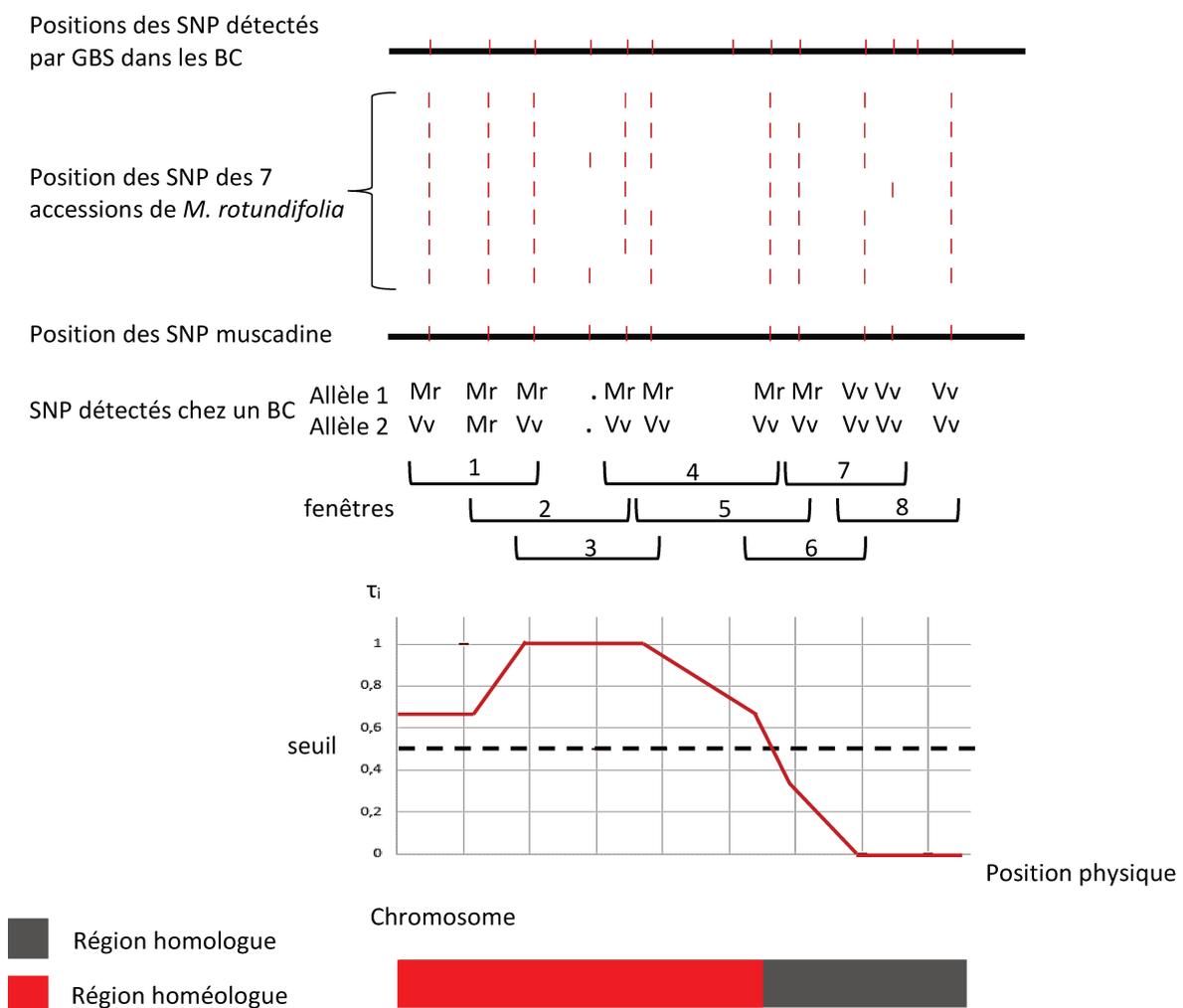


Figure II.1. Principe de l'analyse réalisée pour le chromosome painting

$$\tau_i = \frac{Nr_i}{Np_i}$$

avec : - τ_i : le taux de SNP issus de *M. rotundifolia* dans la fenêtre i

- Np_i : le nombre de SNP issus de *M. rotundifolia* pouvant être présents dans la fenêtre i

- Nr_i : le nombre de SNP issus de *M. rotundifolia* détectés dans la fenêtre i

Un seuil a été fixé au-delà duquel la région a été considérée comme *M. rotundifolia*. Ce seuil a été établi pour chaque population en fonction du niveau de BC et de la qualité des données.

b. Comparaison phénotypique de *V. vinifera* et *M. rotundifolia*

La comparaison des deux espèces a été réalisée à deux niveaux : à l'échelle macroscopique, avec l'étude des caractères phénologiques et morphologiques, et à l'échelle moléculaire, avec l'étude des métabolites secondaires des feuilles et des baies.

i. Phénologie et morphologie

La liste des caractères à étudier et les échelles de notation ont été établies à partir de la liste des descripteurs de l'Office International de la Vigne et du Vin pour les variétés et espèces de *Vitis* (Anonyme, 2009), de la bibliographie (Bouquet, 1980; Goffinet *et al.*, 2001; Patel & Olmo, 1955), et d'observations directes (la liste complète des caractères et des échelles de notation est détaillée en Annexe 2).

La méthode des sommes de température a été utilisée pour caractériser les dates de débourrement, de floraison et de véraison. La date de maturité n'a pas été étudiée car pour récolter les baies de manière homogène une maturité technologique a été fixée trois semaines après véraison. Duchêne *et al.* (2010) ont déterminé les températures de base pour les trois périodes de développement de la vigne, du 15 février au débourrement, du débourrement à la floraison et de la floraison à la véraison, comme étant de -2°C, 7°C et 3°C, respectivement. Cependant, aucune valeur n'a été établie pour *M. rotundifolia*. Pour cela, le développement de quatre rameaux de *M. rotundifolia* et quatre rameaux de *V. vinifera*, poussant dans les mêmes conditions, a été suivi sur une période allant du débourrement à après la floraison. Le nombre de feuilles apparaissant en une semaine pour chaque rameau a été compté et positionné sur un graphique en fonction de la température moyenne mesurée pendant la semaine (moyenne de $(T_{\min} + T_{\max})/2$ journalier). La droite de régression du nombre de feuilles apparues en fonction de la température moyenne a été établie et la température de base a été estimée comme étant la température pour laquelle aucune feuille n'apparaissait (intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses).

ii. Métabolites secondaires des feuilles et des baies

Les métabolites secondaires des feuilles et des baies ont été étudiés à l'aide de deux techniques de chromatographie différentes : la chromatographie gazeuse (GC) pour détecter les composés volatiles des baies, la chromatographie liquide (LC) pour détecter les composés non volatiles des feuilles et des baies.

Extraction des échantillons de baies

Environ 40 g de baies ont été échantillonnées sur plusieurs grappes pour chaque accession. Le protocole d'extraction a été adapté de Duchêne *et al.* (2009) (Figure II.2). Dans un premier temps, les baies congelées ont été décortiquées afin de retirer les pépins, puis broyées dans de l'azote liquide. Pour limiter l'oxydation du broyat, 40 mL d'eau contenant 40 mg de sulfite de sodium ont été ajoutés. Une solution de 3-octanol (20 μ L, 1 g/L) a été ajoutée à chaque échantillon en tant que standard interne pour l'analyse GC. L'échantillon a ensuite été centrifugé (27 min, 12 500 rpm, 4°C) et le surnageant filtré pour éliminer les particules solides. Une solution d'apigénine (150 μ L, 100 mg/L) a été ajoutée en tant que standard interne pour l'analyse LC. L'échantillon a été passé sur une colonne SPE de type C18

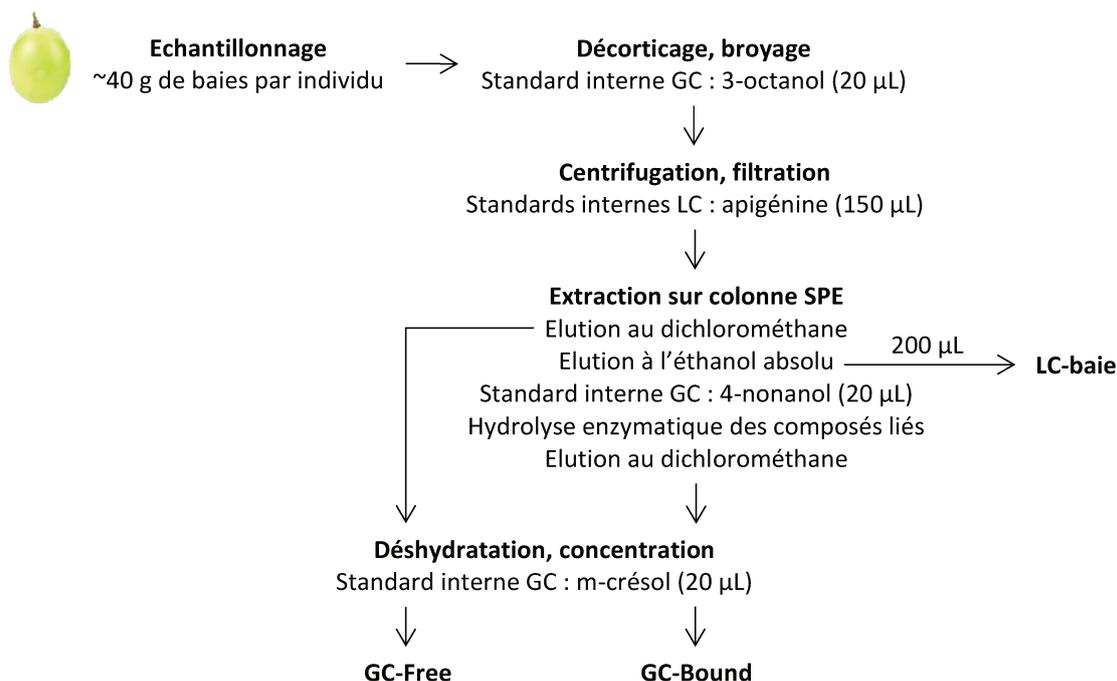


Figure II.2. Protocole d'extraction des métabolites volatiles et non volatiles des baies pour les analyses en chromatographies gazeuse et liquide

(Solid phase extraction), préalablement rincée avec 5 mL de méthanol et 15 mL d'eau ultra pure. La colonne a de nouveau été rincée avec 15 mL d'eau ultra pure, puis les composés volatiles ont été extraits à l'aide de 4 mL de dichlorométhane (GC-Free). Les composés restants ont été extraits à l'aide de 4 mL d'éthanol absolu. De cet extrait, 200 µL ont été prélevés pour les analyses en LC (LC-Baie). Puis, 20 µL d'une solution de 4-nonanol (1 g/L) ont été ajoutés en tant que standard interne pour l'analyse GC. L'échantillon a ensuite été dilué dans 40 mL de tampon citrate/phosphate (pH 4,5) et incubé toute la nuit à 37,5°C avec 50 mg d'enzyme glycolytique AR2000 (Gist-Brocades, Seclin, France) pour hydrolyser les liaisons glycosidiques des composés volatiles glycosylés. L'échantillon a été passé sur la colonne SPE, préalablement rincée avec 5 mL de méthanol et 15 mL d'eau ultra pure. La colonne a de nouveau été rincée avec 15 mL d'eau ultra pure, puis les composés volatiles libérés ont été extraits à l'aide de 4 mL de dichlorométhane (GC-Bound). Les extraits GC-Free et GC-Bound ont ensuite été déshydratés à l'aide de pipettes Pasteur remplies de 0,5 g de sulfite de sodium anhydre et de coton cardé, puis concentrés sous un flux d'azote pour obtenir 500 µL d'échantillon. Une solution de m-crésol (20 µL, 1 g/L) a été ajoutée en tant que standard externe pour l'analyse GC.

Extraction des échantillons de feuilles

Deux feuilles ont été prélevées pour chaque accession (Figure II.3). Sur chaque feuille, quatre disques de 20 mm de diamètre ont été découpés. Trois de ces disques ont été placés à l'étuve à 180°C pendant une nuit pour connaître le poids sec d'un disque. Le quatrième disque a été utilisé pour l'extraction. Une solution de méthanol/eau (1/1) contenant de la diosmétine (2 µg/mL) comme standard interne a servi de solvant. Pour 1 mg de poids sec de feuille, 70 µL de ce solvant ont été ajoutés. L'échantillon a ensuite été chauffé 30 min à 65°C.

Analyse des extraits de baies en GC-MS

Les extraits GC-Free et GC-Bound ont été analysés à l'aide d'un système de chromatographie gazeuse Agilent 6890 équipé d'un Autosampler Gerstel MP2 et d'un spectromètre de masse Agilent 5973N permettant la détection des pics et l'identification des composés. Le chromatographe était équipé d'une colonne DB-Wax (30 m × 0,32 mm i.d., film de 0,5 µm d'épaisseur, J&W Scientific).

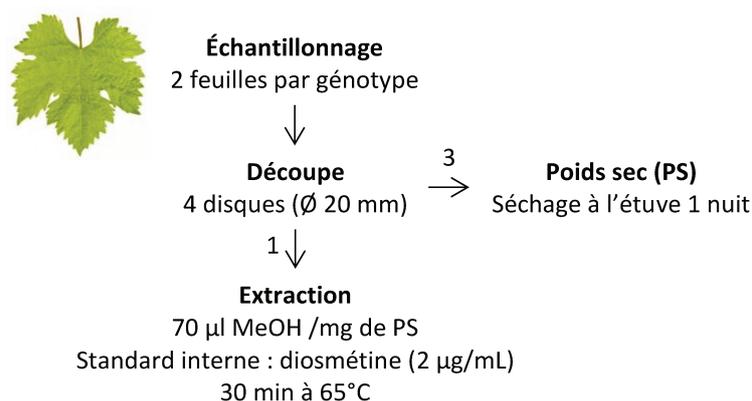


Figure II.3. Protocole d'extraction des métabolites non volatiles des feuilles pour l'analyse en chromatographie liquide

L'hélium a été utilisé comme gaz porteur avec un débit de 1,5 mL/min. La température du four a été programmée pour varier de 45°C à 235°C avec une élévation de température de 2,7°C/min. L'injecteur a fonctionné à 230°C en mode sans division (15 psi pendant 0,50 min). Les températures du capillaire de transfert des ions et de la source d'ionisation étaient à 270°C et 230°C, respectivement. La source d'ionisation à impact électronique a fonctionné en mode positif à 70 eV. Les spectres ont été enregistrés sur la gamme de masse m/z 30 à 400 unité de masse atomique (u.m.a.). Le logiciel Agilent MSD ChemStation (G1701DA, Rev D.03.00) a été utilisé pour le contrôle des instruments et l'acquisition des données.

Pour l'analyse non ciblée, les fichiers de données brutes ont été convertis au format netCDF à l'aide du logiciel Agilent ChemStation. Ces fichiers ont ensuite été traités à l'aide du package XCMS du logiciel R. Cette analyse a permis de générer un fichier .csv avec l'ensemble des ions détectés dans les échantillons et la surface de leur pic calculée pour chaque individu. Parmi les ions détectés, un premier filtre a été réalisé pour ne conserver que les ions potentiellement spécifiques, c'est-à-dire les ions pour lesquels l'aire minimale mesurée chez *M. rotundifolia* était supérieure à l'aire maximale mesurée chez *V. vinifera*. L'identification des métabolites associée à ces ions a été réalisée grâce à l'adéquation des spectres de masse observés avec ceux de la base de données NIST-14, à la comparaison des index de rétention et à la comparaison à des standards, lorsqu'ils étaient disponibles. Une analyse ciblée a ensuite été effectuée sur ces métabolites pour mesurer précisément l'aire des pics. Les données ont été normalisées par rapport aux standards internes (3-octanol pour l'extrait GC-Free et 4-nonanol pour l'extrait GC-Bound).

Analyse des extraits de feuilles et de baies en LC-MS

Les extraits de feuilles et LC-Baie ont été analysés à l'aide d'un système de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC ; Dionex Ultimate 3000 ; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) équipé d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD). La chromatographie a été réalisée sur une colonne Nucleodur HTec (150 mm x 2 mm diamètre interne, particules de 1,8 µm de diamètre ; Macherey-Nagel, Düren, Germany) maintenue à 30°C. La phase mobile était composée des solutions acétonitrile/acide formique (0,1 %, v/v) (éluant A) et eau/acide formique (0,1 %, v/v) (éluant B) à un débit de 0,25 mL/min. Le gradient d'éluant utilisé a été le suivant : 0 – 4 min, 80 – 70 % B ; 4 – 5 min, 70 – 50 % B ; 5 – 6,5 min, 50 % B ; 6,5 – 8,5 min, 50 – 0 % B ; 8,5 – 10 min, 0 % B. Le volume d'échantillon injecté était de 1 µL. Le système de chromatographie liquide a été couplé à un spectromètre de masse Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) équipé d'une source d'ionisation électrospray opérant en mode positif ou en mode négatif. Les paramètres ont été fixés à 350°C pour la température du capillaire de transfert des ions, 3400 V pour le voltage de l'aiguille de nébulisation en mode positif et -2500 V en mode négatif. Les débits d'azote du gaz de nébulisation (sheath gas) et du gaz auxiliaire

(auxiliary gas) ont été maintenus à 40 et 5 (unité arbitraire), respectivement. Les spectres ont été enregistrés sur la gamme de masse m/z 110 – 1200 u.m.a., avec une résolution de 50 000 à m/z 200 u.m.a. Le système a été calibré en interne à l'aide de phthalate de dibutyl en tant que masse de référence (m/z 279,1591), permettant une précision en masse inférieure à 1 ppm. Les instruments ont été contrôlés par le logiciel Xcalibur.

L'analyse non ciblée des données a été réalisée à l'aide du package Xcms du logiciel R. Les fichiers de données brutes ont été convertis au format mzXML. Les paramètres utilisés pour la fonction `xcmsSet` du package XCMS étaient les suivants : `method to detect = "centWave"`, `ppm = 2`, `noise = 50000`, `mzdiff = 0.001`, `prefilter = c(5,15000)`, `snthresh = 6`, `peakwidth = c(6,35)`. Les pics ont été alignés sur tous les échantillons à l'aide de la fonction `group.density`, avec les paramètres suivants : `bw = 10`, `mzwid = 0.0025`. Un fichier `.csv` a été généré avec l'ensemble des ions détectés dans les échantillons et la surface de leur pic calculée pour chaque individu. Un premier filtre a été réalisé pour ne conserver que les ions potentiellement spécifiques, c'est-à-dire les ions pour lesquels la surface minimale mesurée chez *M. rotundifolia* était supérieure à la surface maximale mesurée chez *V. vinifera*. Une analyse ciblée a ensuite été réalisée sur ces ions. L'intégration des pics a été effectuée à l'aide du logiciel Xcalibur, et vérifiée manuellement. Les données ont été normalisées par rapport aux standards internes (diosmétine pour les feuilles et apigénine pour les baies). L'identification des ions détectés s'est appuyée sur la comparaison de leur spectre de masse et de leur temps de rétention à ceux d'un standard analysé dans les mêmes conditions, lorsque celui-ci était disponible.

c. Déterminisme génétique des caractères phénotypiques spécifiques de *M. rotundifolia*

Le déterminisme génétique des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* a été étudié pour les caractères phénologiques, morphologiques et pour les métabolites secondaires des feuilles.

i. Acquisition des données phénotypiques

Les caractères phénotypiques ont été mesurés sur les populations de BC et leurs parents. Les caractères morphologiques ont été évalués de la même manière que pour la comparaison entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*. Pour la phénologie, la base de température utilisée était celle de *V. vinifera*, car il aurait été fastidieux de l'établir pour chaque individu.

Les extractions de feuilles pour l'analyse en LC ont été différentes. En effet, lors de la comparaison des deux espèces, chaque individu était représenté par deux feuilles extraites séparément, et chaque feuille des individus d'une espèce était considérée comme une répétition (n individus donnant $n \times 2$ répétitions). Pour l'étude des BC, les prélèvements de chaque individu devaient représenter cet individu. Pour augmenter la représentativité des mesures, trois feuilles ont été prélevées pour chaque individu. Un disque de 14 mm a été découpé dans chaque feuille et les trois disques d'un même individu ont été extraits en même temps avec 60 μ L de solution méthanol/eau (1/1) pour 1 mg de poids sec.

ii. Analyse QTL

L'analyse QTL des caractères phénologiques, morphologiques et des métabolites secondaires a été réalisée de la même manière à l'aide des données phénotypiques acquises sur les populations de BC et des cartes génétiques SNP à haute densité. L'héritabilité au sens large de chaque caractère a été calculée selon la formule (Gallais, 1989) :

$$\hat{h}_L^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \hat{\sigma}_e^2}$$

avec $\hat{\sigma}_g^2$ la variance génotypique et $\hat{\sigma}_e^2$ la variance résiduelle, estimées à l'aide d'une analyse de variance.

L'analyse du déterminisme génétique a été réalisée à l'aide du package R/qtl du logiciel R (Broman *et al.*, 2003). Etant donnée la nature des données acquises grâce à la LC, ces dernières ont été transformées à l'aide de la fonction log10 pour les valeurs non nulles, les valeurs nulles étant fixées à 0 (D_{\log}). Un jeu de données binaire a été créé en fixant à 1 toutes les valeurs supérieures à 0 (D_{bin}). Enfin, un dernier jeu de données a été établi à partir de D_{\log} en considérant toutes les valeurs nulles comme des données manquantes. Lors de l'analyse, différents modèles de la fonction scanone ont été utilisés : le modèle 2-part pour D_{\log} , le modèle binaire pour D_{bin} et pour les caractères morphologiques binaires, et le modèle normal pour D_{cond} et les caractères phénologiques et morphologiques. Le seuil de significativité du LOD score a été déterminé à l'aide d'un test de permutations, simulant 1000 permutations des données phénotypiques ($\alpha = 0,05$). Les positions des facteurs génétiques (qualitatifs ou quantitatifs) ont été établies à la position du LOD maximum et les intervalles de confiance ont été estimés comme étant la région autour du pic de LOD dans laquelle le LOD score diminue de 1 LOD.

Chapitre III :
Étude de l'évolution
des recombinaisons le long
du génome et introgression
des régions issues de
Muscadinia rotundifolia

III. Étude de l'évolution des recombinaisons le long du génome et introgression des régions issues de *Muscadinia rotundifolia*

1. Introduction

Dans le cadre de la création de variétés de vigne résistantes aux maladies, l'objectif de l'introgression est de substituer le fond génétique de *M. rotundifolia* par celui de *V. vinifera* tout en conservant les locus porteurs des gènes de résistance. Deux points cruciaux doivent être vérifiés lors de l'introgression : l'obtention d'hybrides fertiles pour assurer les croisements successifs et l'élimination des régions chromosomiques de *M. rotundifolia* au profit de *V. vinifera*.

L'obtention d'hybrides fertiles a longtemps été un obstacle lors des croisements entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, les quelques hybrides obtenus étant généralement stériles ou très peu fertiles. Ce manque de fertilité a longtemps été attribué à la différence de nombre chromosomique entre les deux espèces ($2n = 38$ pour *V. vinifera* et $2n = 40$ pour *M. rotundifolia*). En effet, les hybrides possédant 39 chromosomes, le mésappariement de chromosomes lors de la méiose des hybrides peut être à l'origine du manque de viabilité des gamètes. Cependant, les études se contredisent quant à la corrélation entre appariement des chromosomes en méiose et fertilité des hybrides (Bouquet, 1980 ; Jelonkovic & Olmo, 1968). La différence de nombre chromosomique a été expliquée par Blanc *et al.* (2012) : les chromosomes 7 et 20 de *M. rotundifolia* correspondent respectivement aux parties inférieures et supérieures du chromosome 7 de *V. vinifera*. En outre, lors de cette étude, un niveau de macrosynténie élevé entre les deux espèces a été observé sur l'ensemble du génome. Dans ce contexte, l'étude de l'appariement des chromosomes pendant la méiose est nécessaire. Cependant, ceci recourt à des techniques lourdes et difficiles à mettre en place. Au contraire, l'étude des taux de recombinaison peut être réalisée grâce à des techniques de génétique simples et rapides et fournit une bonne estimation de l'appariement des chromosomes pendant la méiose.

L'élimination des régions issues de *M. rotundifolia* lors des croisements impose la mise en place d'outils permettant d'identifier et de suivre ces régions dans les différents niveaux de backcross, afin de choisir les meilleurs géniteurs. Ce suivi peut être réalisé par l'étude du phénotype des populations de backcross mais nécessite pour cela plusieurs années d'observations entre générations. Une méthode plus rapide consiste à suivre l'introgression des gènes de résistance grâce à l'utilisation de marqueurs microsatellites. Néanmoins, la densité de marqueurs n'est pas suffisante pour s'assurer de l'élimination de toutes les régions issues de *M. rotundifolia*. Il faut alors développer un marquage à haute densité du génome.

L'étude de la transmission des régions issues de *M. rotundifolia* permet d'identifier les régions préférentiellement transmises ou préférentiellement éliminées. Ces biais dans la ségrégation par rapport à la ségrégation mendélienne sont généralement dus à des problèmes de fertilité du parent ou de mortalité de la descendance. Ils ont pour conséquence une diminution de l'éventail des combinaisons génotypiques disponibles dans la descendance.

Dans un objectif de meilleure compréhension des phénomènes génétiques impliqués dans les croisements entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, la variation du taux de recombinaison le long du génome ainsi que la transmission des régions issues de *M. rotundifolia* ont été étudiés. Ces travaux ont fait l'objet d'un manuscrit intitulé « Introgression reshapes recombination distribution in grapevine interspecific hybrids » présenté ci-après. Dans cette étude, la technique de GBS a été utilisée pour générer des SNP en grande quantité sur trois populations de différents niveaux de pseudo-backcross. Les données supplémentaires de l'étude sont présentées dans l'Annexe 1.

2. Introgression reshapes recombination distribution in grapevine interspecific hybrids

Marion Delame^{1,2}, Emilce Prado¹, Sophie Blanc¹, Guillaume Robert¹, Christophe Schneider¹, Pere Mestre¹, Camille Rustenholz¹, Didier Merdinoglu^{1*}

¹Université de Strasbourg, INRA, SVQV UMR-A 1131, F-68000 Colmar, France

²AgroParisTech, Direction des Formations Doctorales, 19 avenue du Maine, 75015 Paris, France

* Corresponding author

E-mail : didier.merdinoglu@inra.fr

Author Contributions

Conceptualization: DM. Formal analysis: MD SB. Funding acquisition: DM. Investigation: MD EP PM. Methodology: DM MD CR GR. Project administration: DM. Resources: CS. Supervision: DM CR MD. Visualization: MD. Writing - original draft: MD DM. Writing - review & editing: MD DM CR EP PM.

Abstract

Muscadinia rotundifolia, an American species related to the cultivated European grapevine *Vitis vinifera*, has a high level of resistance to several grapevine major diseases. Being particularly interesting for grape breeding, resistance factors from *M. rotundifolia* have been transferred into a cultivated background while eliminating the unwanted cultural traits and off-flavours by backcross-based introgression. However, crosses between both species most often led to sterile hybrids and developmental abnormalities in the offspring. In this context, identify the genetic and genomic features difficulting crosses between the two species is essential. To this end, three mapping populations were generated by pseudo-backcrosses using *M. rotundifolia* as the donor parent and several *V. vinifera* cultivars as the recurrent parents. Genotyping-by-sequencing was used to establish high-density genetic linkage maps and to determine the genetic composition of each chromosome of the analysed individuals. A good collinearity of the SNP positions was observed between parental maps, confirming the synteny between both species, except on lower arm of chromosome 7. Several large regions displaying species-related distortions of segregation were identified. Interestingly on partially hybrid chromosome pairs, we observed that recombination events are enhanced in homologous regions (*V. vinifera* - *V. vinifera*) and suppressed on homeologous (*V. vinifera* - *M. rotundifolia*). Altogether, these results provide new insight to improve the use of *M. rotundifolia* in grape breeding, notably to optimize the introgression process.

Author summary

Wild plant species related to crops have provided plant breeders with a wide range of genetic resources, largely for the improvement of varieties for resistance to pests and diseases. But breeders often face the challenge of obtaining viable and fertile interspecific hybrids. Grapevine is a crop particularly threatened by many pests and diseases. Muscadine grape is a related species which displays resistance to many major grapevine pathogens, which makes it particularly interesting for grape breeding. Unfortunately, muscadine is difficult to cross with cultivated grapevine. Here, we take advantage of recent advances in high throughput genotyping methods to examine the genetic recombination in interspecific hybrids derived from crosses between cultivated grapevine and muscadine. We show that recombination distribution along the chromosomes is similar to grapevine

in interspecific hybrids, when the chromosome pair is composed by one entire chromosome of each species. Interestingly, when in a chromosome pair one chromosome is derived from a crossover between grapevine and muscadine, recombination rate increases in homologous (grapevine-grapevine) regions, whereas it dramatically decreases in hybrid (grapevine-muscadine) regions. Our results bring new insight to address and overcome the difficulties met in the exploitation of wild species through interspecific crosses in grape breeding.

Introduction

Wild species related to crops have provided plant breeders with a wide range of genetic resources which have contributed to the emergence of modern agriculture and to the agricultural economy world-wide. Wild relatives have proved useful in breeding for different traits, including abiotic stress tolerance, yield, quality, male sterility. Among these traits, pest and disease resistance account for 80% of the cases where genes derived from wild relatives have been transferred to cultivated species over the last century [1]. Despite the undeniable importance of wild species in crop improvement for disease resistance, breeders have often faced the challenge of obtaining viable and fertile interspecific hybrids, which has consequently limited the optimal use of wild genetic resources [1-7].

Grapevine is a crop particularly threatened by many severe pests and diseases. Indeed, from the 19th century, European viticulture has undergone radical changes as a result of the introduction of major diseases from North America: powdery mildew, downy mildew and phylloxera, respectively caused by the fungus *Erysiphe necator*, the oomycete *Plasmopara viticola* and the insect *Daktulosphaira vitifoliae*. Almost all the European grapevine cultivars (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*) are susceptible to these pathogens. Many sources of resistance were found in Asian and American wild *Vitis* species [8-10] and several genetic factors conferring protection against downy mildew, powdery mildew and phylloxera have been recently identified [11-16]. Aside from true *Vitis* species, *Muscadinia rotundifolia* is a North American grapevine related to *V. vinifera* which has the unique feature of displaying a high resistance level to many major grapevine pathogens: *E. necator*, *P. viticola* and *D. vitifoliae* but also *Guignardia bidwellii*, the fungus responsible for black-rot disease, *Xiphinema index*, the nematode vector of grapevine fanleaf virus, and *Xylella fastidiosa*, the bacteria responsible for Pierce's disease [17-20].

M. rotundifolia being particularly interesting for grape breeding, crosses with *V. vinifera* were attempted as soon as the end of the 19th century and a first success was obtained by Detjen [21]. In the 1980s, successful crosses produced fertile hybrids and allowed the use of *M. rotundifolia* in French breeding programs [22]. Backcross-based introgressions were attempted to transfer resistance factors from *M. rotundifolia* into cultivated backgrounds while eliminating the unwanted cultural traits and off-flavours. Meanwhile, genetic factors conferring resistance to powdery and downy mildew were identified and molecular markers allowing marker-assisted selection were developed [14, 23-28]. However, the poor vigour and low fertility of the *V. vinifera* x *M. rotundifolia* hybrids and backcrosses hampered a broader and convenient utilization of *M. rotundifolia* in breeding programs. The low rate of successful crosses and the sterility of interspecific hybrids were first attributed to the difference in chromosome numbers between both species, $2n=38$ chromosomes for *V. vinifera* vs $2n=40$ for *M. rotundifolia*. Cytogenetic studies showed that some mismatches between chromosomes of the same pair occur during meiosis of F1 hybrids and of individuals derived from the first pseudo-backcross [29-30]. But the small size of the chromosomes did not allow determining which ones were really involved in these mismatches. Blanc *et al.* [27] established a genetic linkage map of *M. rotundifolia* using SSR markers that showed a high level of macrosynteny with *V. vinifera*. The same work also revealed that chromosome 7 of *V. vinifera* matches with chromosomes 7 and 20 of *M. rotundifolia*, then explaining

the origin of the difference of chromosome number between both species. Nevertheless, although the higher genetic distance existing between *Vitis* and *Muscadinia* compared to the genetic distance between *Vitis* subgenus species [31] could explain the low prolificity and fertility of interspecific crosses, the underlying mechanisms are still unknown.

In order to understand the compatibility between the genomes of *M. rotundifolia* and *V. vinifera*, we decided studying the recombination rate between homeologous chromosome pairs (i.e. composed of one chromosome from *V. vinifera* and one from *M. rotundifolia*) in interspecific hybrids. Our study is based upon pseudo-F1 hybrids derived from crosses between *M. rotundifolia* and *V. vinifera* and pseudo-backcross populations derived from successive crosses between pseudo-F1 hybrids and various *V. vinifera* cultivars. The genetic maps previously developed with these populations were mainly built thanks to microsatellite markers and did not offer a density of markers sufficient for a fine analysis of recombination rate along the chromosomes [24, 26]. Genotyping-by-sequencing (GBS) appears to be a simple and robust method allowing the discovery of thousands of SNPs for hundreds of individuals rapidly and at low cost [32]. Here we use GBS to perform a fine-scale analysis of the recombination rate along the genome in various interspecific contexts represented by three pseudo-backcross populations derived from *M. rotundifolia* and *V. vinifera* at different level of introgression. This tool will improve the process of introgression of resistance genes from *M. rotundifolia* into *V. vinifera*.

Results

Chromosome painting

Re-sequencing and GBS data were used to locate introgressed regions remaining in each BC individual. GBS was performed on 357 individuals belonging to three mapping populations derived from backcrosses between *M. rotundifolia* and *V. vinifera* (BC1, BC2 and BC4, S1 Table), leading to the detection of 263,034 SNPs. In parallel, in order to identify *Muscadinia*-specific regions, we searched for *Muscadinia*-specific SNPs using sequencing data available for seven accessions of *M. rotundifolia*. Finally, we selected for *Muscadinia*-specific SNPs that were identified as polymorphic in the GBS data. Out of the 263,034 SNPs detected by GBS, 91,865 SNPs were found in *M. rotundifolia* cv. Trayshed, which is the accession at the origin of BC1 and BC4 populations, and 110,815 SNPs in the seven accessions of *M. rotundifolia* taken altogether.

To perform chromosome painting, a rate of SNPs coming from *M. rotundifolia*, τ_i , was calculated as the ratio of the number of detected SNPs from *M. rotundifolia* on those potentially found, using sliding windows of 20 SNPs. A threshold was set to balance the chance to detect a false homeologous region and the chance not to detect a true homeologous region. When the rate was above the threshold, the region was identified as homeologous (*V. vinifera* - *M. rotundifolia*). In the F1 hybrid, the threshold was set to 0.6, the highest value which allowed to detect the entire genome as homeologous, as expected. For the BC1 and BC4 populations, analysis was performed using the 91,865 SNPs from Trayshed and a τ_i threshold of 0.6. Because of a lack of information on the *M. rotundifolia* parent of the BC2 population, analysis was performed using the 110,815 SNPs set and the τ_i threshold was set to 0.5.

In individual 1771P, parent of BC4 population, five regions derived from *M. rotundifolia* were identified, on chromosomes 8, 13, 14, 18 and 19 (Fig 1A). Analysis in the BC4 population revealed the recombination events taking place in homeologous regions. (Table 1). In chromosomes 8, 18 and 19, which bore a large *M. rotundifolia* region covering over 80% of the chromosome length, respectively 15%, 32% and 13% of the individuals showed a recombination event in these homeologous regions. Conversely, in chromosomes 13 and 14, carrying a smaller *M. rotundifolia* region covering respectively

24.7% and 30.3% of the chromosome length, only one individual out of 79 displayed a recombination event in these homeologous regions.

Fig 1. Chromosome painting of parental hybrids 1771P and 22-8-78. Chromosomes are horizontally represented with their physical length on the x-axis. Homeologous regions (*V. vinifera* - *M. rotundifolia*) are in red; homologous regions (*V. vinifera* - *V. vinifera*) are in dark grey. (A) Individual 1771P, hybrid parent of the BC4 population. (B) Individual 22-8-78, hybrid parent of BC2 population.

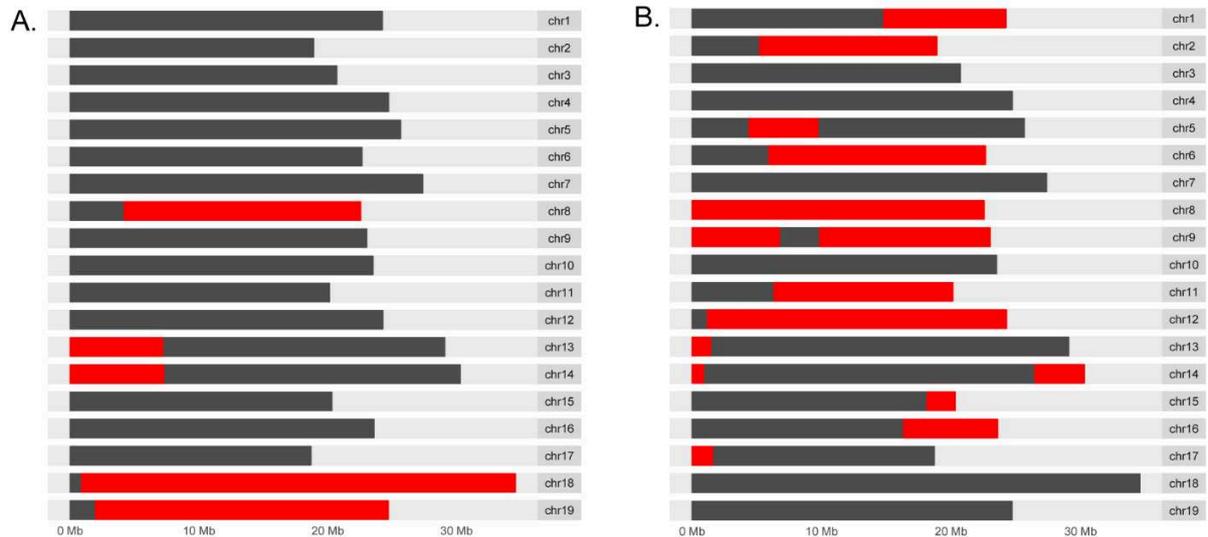


Table 1. Relative length of homeologous regions of 1771P parent and recombination in BC4 population. For each chromosome, the proportion of homeologous regions (PHr) is calculated as the ratio between the length of the homeologous region (LHr) and the chromosome length (CL). IR1: number of individuals having one recombination event in the homeologous region. Population size: 79 individuals.

Chromosome	CL (Mb)	LHr (Mb)	PHr (%)	IR1
8	22.55	18.34	81.3	12
13	29.08	7.17	24.7	1
14	30.27	7.25	30.3	1
18	34.57	33.66	97.4	25
19	24.70	22.71	92.0	10

In individual 22-8-78, parent of BC2 population, regions from *M. rotundifolia* were identified on 13 out of 19 chromosomes (Fig 1B). Chromosomes 3, 4, 7, 10, 18 and 19 derived entirely from *V. vinifera* whereas chromosomes 8, 9 and 12 were almost totally from *M. rotundifolia*. Interestingly, chromosome 14 carried two distal telomeric regions derived from *M. rotundifolia*, revealing two likely crossovers for the meiosis of the corresponding pseudo-F1 parent. Analysis in the BC2 population revealed the recombination patterns in the homeologous regions (Table 2). For chromosomes 8, 9 and 12, characterized by a homeologous region covering over 85% of the chromosome, a substantial number of recombination events was observed, with respectively 47%, 29%, and 19% of the individuals displaying at least one or more crossovers. Conversely, for chromosomes carrying small homeologous regions, i.e. covering less than 25% of the chromosome length, less than 1% of the individuals displayed a recombination event. Finally, in cases where the homeologous region covered between 25% and 85%

of the chromosome, the number of recombination events observed was variable (0-5% of the individuals depending on the chromosome) but never high.

Table 2. Relative length of homeologous regions of 22-8-78 parent and recombination in BC2 population. For each chromosome, the proportion of homeologous regions (PHr) is calculated as the ratio between the length of the homeologous regions (LHr) and the chromosome length (CL). IR1- IR2: number of individuals having one recombination event (IR1) or more (IR2) in the homeologous region. Population size: 210 individuals.

Chromosome	CL (Mb)	LHr (Mb)	PHr (%)	IR1	IR2
1	24.23	9.42	30.4	10	0
2	18.89	13.67	54.6	0	0
5	25.65	5.29	24.4	2	0
6	22.65	16.73	66.9	10	0
8	22.55	22.55	100.0	98	3
9	23.01	19.87	86.4	62	0
11	20.12	13.77	68.4	3	0
12	24.27	23.07	95.1	40	1
13	29.08	14.30	4.9	0	0
14	30.27	4.66	15.4	1	0
15	20.30	2.14	10.6	0	0
16	23.57	7.22	30.6	1	0
17	18.69	1.58	8.5	0	0

Genetic mapping

The 263,034 SNPs detected by GBS were filtered as follows. Only SNPs having less than 5% of missing data were kept. Next, SNPs showing redundancy (providing the same information for genetic mapping) were discarded. Non-redundant SNPs whose parental origin could not be clearly determined and those that were homozygous in both parents were also removed. Finally, SNPs showing a distorted segregation were discarded. After performing all the filtering steps, 3,415, 2,210 and 2,222 SNPs were available for genetic mapping for BC1, BC2 and BC4 populations, respectively. Results of the different filtering steps are presented in Table 3.

Table 3. SNP filtering for genetic mapping. Number of SNP markers after each filtering step for each population. SNPs with segregation distortion were removed for genetic mapping.

Filtering steps	Mapping populations		
	BC1	BC2	BC4
Total SNPs detected	263,034		
SNPs ≤ 5% missing data	9,006	9,132	8,489
Non-redundant SNPs	5,396	6,677	4,068
SNPs with known parental genotype	5,266	6,460	3,868
SNPs with at least one heterozygous parent	4,270	2,943	2,427
SNPs with segregation distortion	855	733	205
SNPs available for genetic mapping	3,415	2,210	2,222

Parental genetic linkage maps were established for the BC1, BC2 and BC4 populations using the above-described SNPs and, respectively 87, 31 and 106 SSR markers. The number of mapped markers depended on the parent types and the backcross levels (Table 4). Overall, hybrid maps showed a higher number of mapped markers than *V. vinifera* maps. The genetic distance covered was quite similar between maps, from 1,153.7 cM (1771P) to 1,455.8 cM (Cabernet Sauvignon), regardless of the parent and the population and was not correlated to the number of mapped markers. The average physical spacing between two successive markers was rather low, especially for hybrid maps which displayed a density of one marker per 0.17 – 0.32 Mbp. Despite the overall high marker density, some local gaps devoid of markers were observed (S1 Fig.).

Table 4. Statistics for parental maps of BC1, BC2 and BC4 populations. Minimum and maximum values observed in individual chromosomes are shown in brackets. Grey background indicates *V. vinifera* maps and white background hybrid maps. A single genetic position is defined as a genetic position at which several markers co-localise.

Mapping population	BC1		BC2		BC4	
Population size	68		248		79	
Parent	♂ Cabernet Sauvignon	♀ 8624	♂ Syrah	♀ 22-8-78	♂ Nebbiolo	♀ 1771P
Number of mapped markers	927	2,860	996	1,516	1,177	1,521
Total length of the map (cM)	1,455.8	1,325.3	1,242.8	1,272.1	1,368.5	1,153.7
Average spacing between single genetic positions (cM)	2.0 (0.9-4.9)	1.6 (0.3-21.2)	1.8 (0.9-7.5)	1.1 (0.3-2.8)	1.2 (0.8-1.8)	1.0 (0.3-1.7)
Average spacing between markers (Mbp)	0.46 (0.25-1.32)	0.15 (0.09-5.25)	0.41 (0.28-2.66)	0.27 (0.13-0.54)	0.37 (0.28-0.59)	0.28 (0.13-0.52)
Extrema of the maximum spacing between markers per chromosome (cM)	6.2-32	3.0-43.9	5.4-18.6	3.5-57.5	5.5-41.9	5.4-47.4
Coverage rate	0.93 (0.79-0.98)	0.96 (0.75-1.00)	0.88 (0.22-0.99)	0.89 (0.11-1.00)	0.95 (0.78-0.99)	0.94 (0.79-0.99)
Contraction rate	1.02 (0.69-1.45)	0.90 (0.62-1.18)	0.85 (0.43-1.19)	0.93 (0.63-1.95)	0.94 (0.76-1.41)	0.80 (0.52-1.39)

A coverage rate was calculated for each chromosome as the ratio of physical distance between distal mapped markers on the total physical chromosome length. The coverage rates were high, varying from 88% to 96% (Table 4) but singularities were identified. Chromosomes 7, 8 and 12 of BC1 hybrid map and chromosome 8 of BC2 hybrid map were entirely covered (S2 Table). Conversely, chromosome 8 of BC2 *V. vinifera* map and chromosome 11 of BC2 hybrid map were poorly covered with respectively 22% and 11% coverage. Despite quite high covering rates, some chromosomes harbour badly covered regions: chromosomes 1, 11, 13 and 15 of the BC1 hybrid map, chromosomes 6 and 16 of the BC2 *V. vinifera* map and chromosomes 1 and 6 of the BC2 hybrid map (S1 Fig.). Low coverage rates have two main origins: i) a low density of SNPs detected in the corresponding regions, e.g. chromosome 6 of both parental maps of the BC2 population, ii) a segregation distortion which led us to eliminate markers from mapping, especially chromosome 13 in the BC1 population and chromosomes 8 and 11 in the BC2 population (S2 Fig.).

A contraction rate was calculated for each chromosome as the ratio of genetic distance and physical distance between the two distal markers. The *V. vinifera* reference map has a calculated contraction rate of 0.9 [33]. Accordingly, a contraction rate above 0.9 means that recombination rate is higher than observed in the grapevine reference map. No difference was observed in average contraction rate between *V. vinifera* and hybrid maps, both reaching a mean value (0.93) very close to the reference linkage map (Table 4). Most chromosomes displayed a contraction rate between 0.8 and 1.0 in most populations, close to the reference, but some particular cases were observed. For instance, chromosome 14 was contracted at different levels in the majority of parental maps, either hybrid or *V. vinifera*. Chromosome 9 was contracted in the hybrid maps, especially in the BC1 and BC2 populations with contraction rates of 0.69 and 0.63, respectively. On the other side, chromosome 7 was dilated in all the *V. vinifera* maps, with contraction rates of 1.45, 1.14 and 1.41 for BC1, BC2 and BC4 populations, respectively (S3 Table).

Transmission rate of M. rotundifolia alleles

To analyse the bias of transmission of *M. rotundifolia* genome in homeologous regions, a transmission rate was calculated for each SNP as the percentage of individuals carrying the *M. rotundifolia* allele of its hybrid parent, for each population. As expected, transmission rates were around 0.5 in the majority of regions (Fig 2). However, some regions showed an unbalanced transmission. For instance, in BC1 population, alleles from *M. rotundifolia* were transmitted in 62% of the offspring on chromosome 1, whereas, on chromosome 11, they were transmitted in only 39% of the offspring. The same pattern of segregation distortion was observed in the BC2 population, with alleles from *M. rotundifolia* being conserved in 68% of the individuals on chromosome 1 and in 17% of the individuals on chromosome 11. A second example is the upper part of the chromosome 13, where alleles from *M. rotundifolia* were present in near than 80% of the BC1 individuals. It is worth noting that the segregation distortion was not always in favour of the *V. vinifera* allele.

Relationship between recombination distribution and level of introgression

The study of recombination showed different behaviours depending on the population.

Both maps of BC1 population showed a high level of collinearity between genetic and physical maps for all chromosomes (S1 Fig.). In the BC1 population, recombination rate was overall similar between both parents, with some exceptions like chromosome 7, which displayed a fall in recombination rate in its lower half (Fig 3A).

In the BC2 population, changes in terms of recombination rates were observed depending on chromosomes. Consequently, marker order was not conserved between BC2 maps in the region where the recombination rate was abnormally low in the hybrid map. In chromosomes completely homologous or homeologous, recombination rates were similar in both parents, like for instance chromosome 4, which is entirely homologous (Fig 3B), and chromosome 8, which is entirely homeologous. Chromosomes that are partially homeologous showed a particular pattern: the hybrid map revealed a higher recombination rate than the *V. vinifera* map in homologous regions, whereas homeologous regions displayed a low recombination rate or, even, did not recombine at all (see chromosomes 2, 12 and 14, Fig 3B). It is worth noting that both parent maps have a similar total genetic length.

The BC4 population showed the same pattern of recombination as observed in the BC2 population not necessarily in the same chromosomes (Fig 3C). For instance, variations in recombination rate along chromosome 5 were similar between both parents. On the contrary, chromosome 14 showed a lower recombination rate on hybrid map than on *V. vinifera* map in the homeologous region of the chromosome and a reversal of trend in the homologous part of the chromosome.

Fig 2. Transmission rate of *M. rotundifolia* SNPs in the BC populations. The transmission rate is calculated for each SNP as the percentage of individuals in a population harbouring the allele from *M. rotundifolia*. (A) Chromosomes 8, 1, 11 and 13 of BC1 population. (B) Chromosomes 8, 1, 11 and 13 of BC2 population. Orange dots show the positions of SNPs used to calculate transmission rate. Homologous regions, lacking *M. rotundifolia* SNPs, are represented with a grey background.

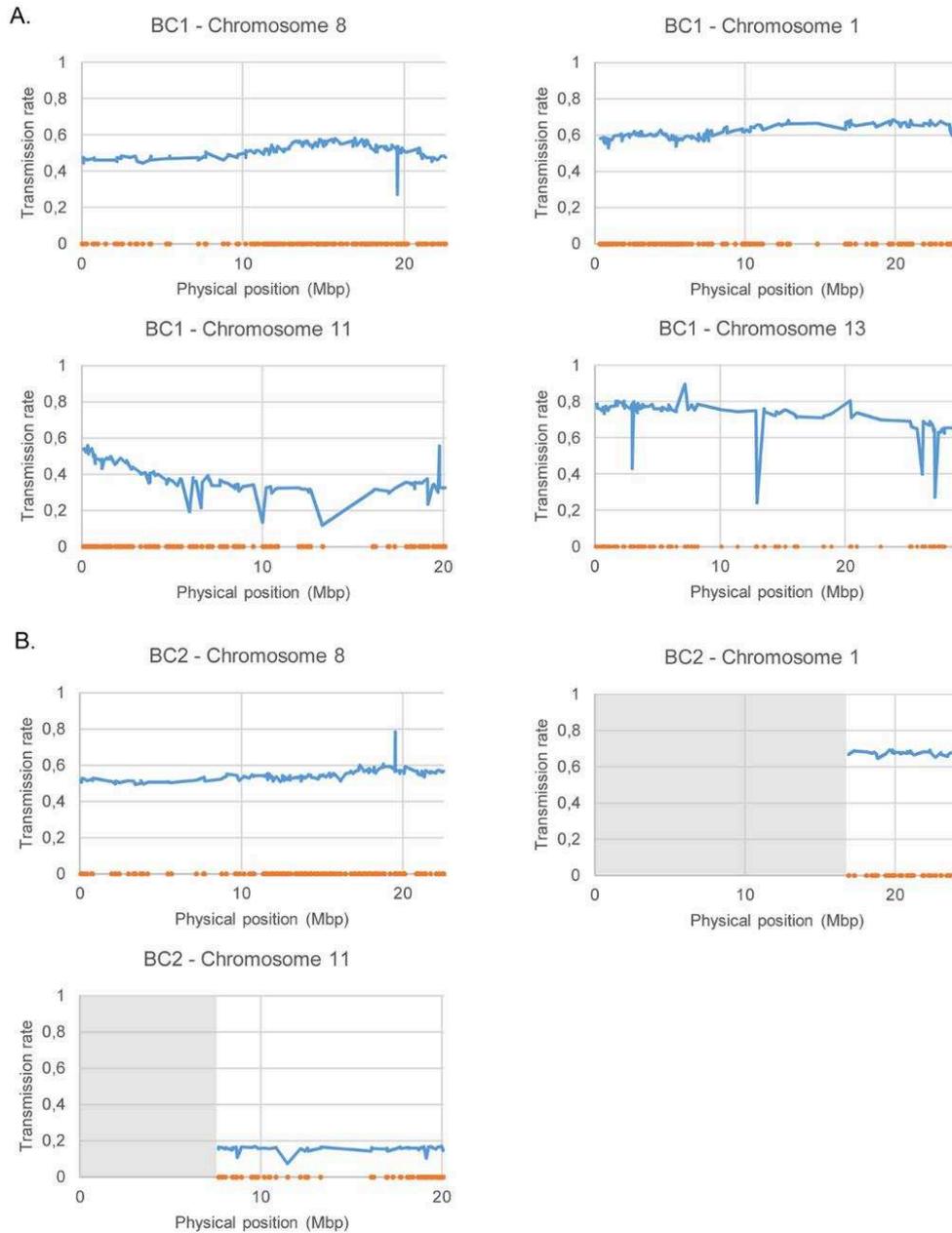
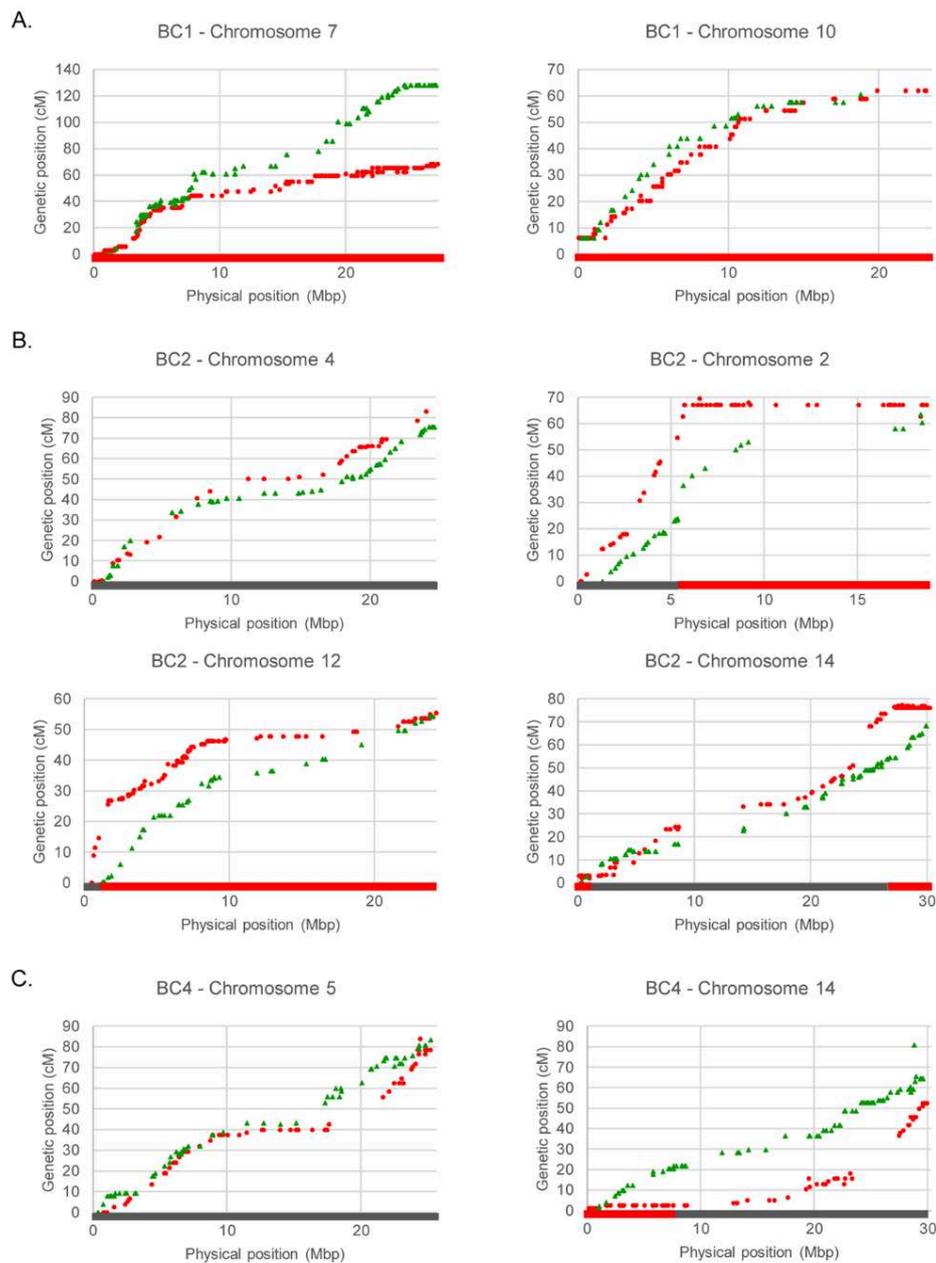
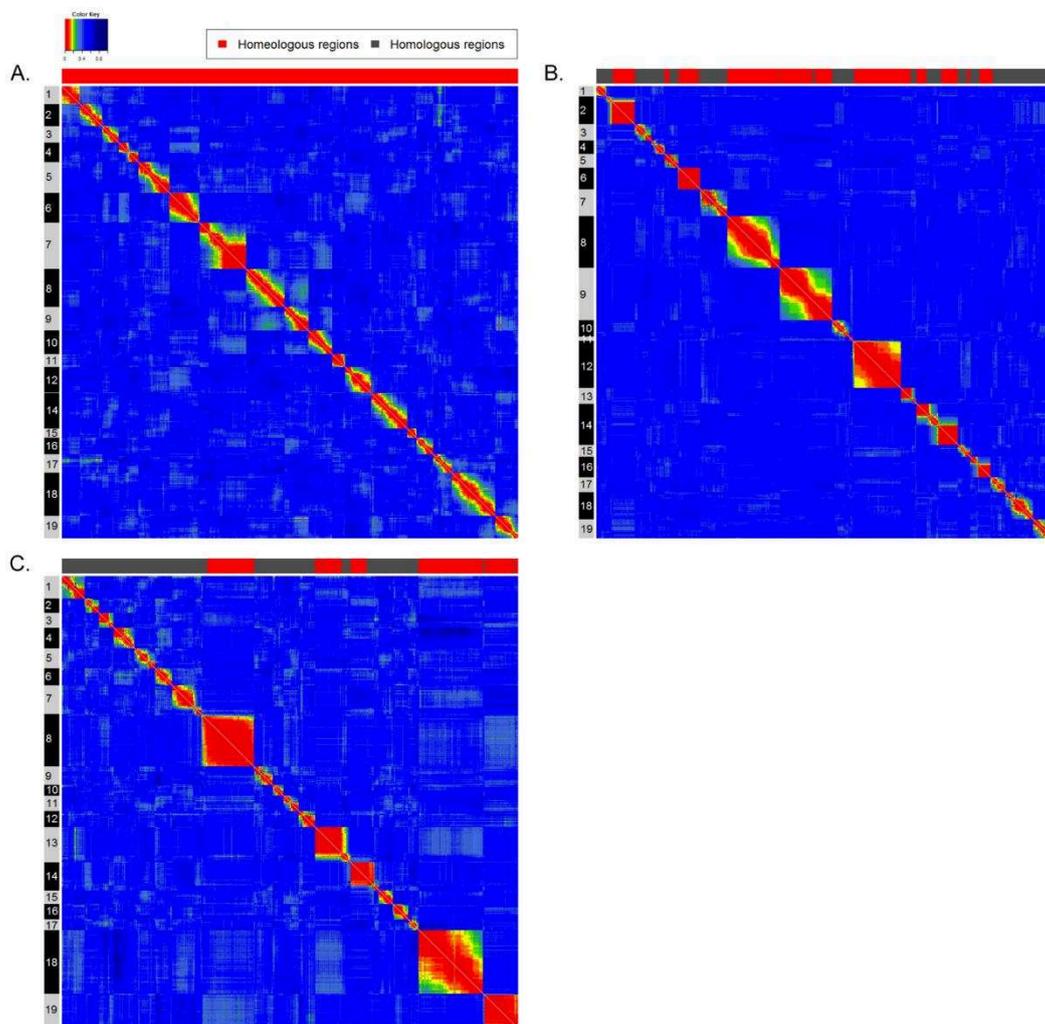


Fig 3. Analysis of recombination rate in homologous vs homeologous regions. Variation of genetic distance depending on physical distance on the hybrid and *V. vinifera* maps. Recombination rate is represented by the slope of the plots. For each cross, *V. vinifera* maps are represented with green triangles, and hybrid maps with red dots. Bars below the graphs show the regions covered by homeologous pairs of chromosomes (in red) and homologous regions (in dark grey) in the hybrid parent of each population. Gaps in the graphs correspond to regions lacking SNPs. (A) Chromosomes 7 and 10 of the BC1 population. (B) Chromosomes 4, 8, 2, 12 and 14 of the BC2 population. (C) Chromosomes 5 and 14 of the BC4 population.



To confirm this observation, the relationship between the recombination fractions and the nature of regions, homologous or homeologous, was studied at the genome scale: as a general rule, low recombination regions matched homeologous regions on the BC2 and BC4 hybrid maps on chromosomes partially homeologous (Fig 4).

Fig 4. Genome-wide analysis of recombination rates. Plot of estimated recombination fractions for all pairs of markers of the BC1 (A), BC2 (B) and BC4 (C) hybrid genetic maps. Markers are plotted ordered on the x-axis and on the y-axis. Recombination fraction is plotted as a colour scale. Red indicates that the two markers, respectively on x-and y-axis, are highly linked (low recombination fraction) and blue indicates that the markers are poorly or not linked (high recombination fraction). Chromosome limits are identified at the left of the heatmap. Homeologous and homologous regions are identified at the top.



Discussion

Although *M. rotundifolia* is highly resistant to numerous grapevine diseases, its use in breeding programs has been limited due to the difficulty to obtain fertile progeny in interspecific crosses. In our study, we used three populations of different level of pseudo-backcross to establish high-density genetic linkage maps of the parents of the populations, allowing studying marker order, segregation distortion and recombination rates across the genome and in introgressed regions.

Synteny and divergence between V. vinifera and M. rotundifolia genomes

GBS allowed detecting SNPs all over the genome in the three crosses analysed. SNPs were identified aligning sequences against the *V. vinifera* reference genome (PN40024 12Xv2). More SNPs were mapped in the hybrid maps than in the *V. vinifera* ones (Table 4) and homeologous regions were better covered than homologous ones (S1 Fig.). As expected, the more advanced is the backcross, the lower is the number of detected SNPs and the higher is the homozygosity. All these observations confirm that sequences are close enough to allow alignment of *M. rotundifolia* reads against the *V. vinifera* genome and show that the divergence between *M. rotundifolia* and *V. vinifera* genomes leads to the identification of higher number of SNPs in homeologous regions.

The comparison of marker order with their physical position in the hybrid map and in the *V. vinifera* linkage map of the BC1 population confirms the high level of macrosynteny between *V. vinifera* and *M. rotundifolia* genomes already observed by Blanc *et al.* [27]. Moreover, no translocation or chromosomal inversion was identified.

Our genetic linkage maps allowed establishing 19 linkage groups. This number is consistent with the 19 pairs of chromosomes of *V. vinifera* and not with the 20 pairs of chromosomes of *M. rotundifolia*. Cytogenetic studies showed that the F1 hybrid carries 39 chromosomes, 19 inherited from *V. vinifera* and 20 inherited from *M. rotundifolia* [29]. Blanc *et al.* [27] showed that linkage groups 7 and 20 of *M. rotundifolia* match respectively the upper and lower arms of chromosome 7 of *V. vinifera*. We showed that allele segregation of chromosome 7 fitted the expected Mendelian ratios. This signifies that, during F1 meiosis, chromosomes 7 and 20 from *M. rotundifolia* and chromosome 7 from *V. vinifera* are equally distributed in the gametes. In addition, recombination rate on the upper part of the chromosome 7 of the BC1 hybrid map was similar to the BC1 *V. vinifera* map whilst in the lower part of the same chromosome, the recombination rate in the hybrid map was extremely low compared to the *V. vinifera* map (Fig 3A). Consequently, we hypothesize that, during meiosis of fertile F1 hybrid, the number of crossovers between *M. rotundifolia* chromosome 7 and the upper part of *V. vinifera* chromosome 7 is normal while it is extremely low between *M. rotundifolia* chromosome 20 and the lower part of *V. vinifera* chromosome 7. This observation reveals a high divergence between both genomes on the lower arm of the chromosome 7 which could partly explain the low level of fertility of pseudo-F1 hybrids [29-30]. In addition, this mismatch allows us to predict the difficulty to introgress in *V. vinifera* a genetic factor carried by *M. rotundifolia* chromosome 20.

Distortion of segregation

Many segregation distortions were observed in the hybrid maps of BC1 and BC2 populations but also in the BC2 *V. vinifera* map (S2 Fig.). This phenomenon is common in interspecific crosses [34-37], but it has also been observed in crosses between *V. vinifera* cultivars [38-39]. However, some particular patterns arise from our results. In fact, the majority of distorted markers that we observed were clustered in large region covering several Mbp, allowing us to discard technical causes, such as multilocus SNPs or scoring errors, which generally generate isolated distorted markers.

Interestingly, the same clusters of distorted markers are shared between BC mapping populations despite mapping populations being derived from two accessions of *M. rotundifolia* and several accessions of *V. vinifera*. Markers on chromosomes 1, 11 and 15 were distorted exactly in the same way in BC1 and BC2 hybrid maps (Fig 2). These distorted clusters are probably caused by genomic specificities of each species rather than to particular accession features. Thus, the risk to observe these distortions in a major part of the crosses between *M. rotundifolia* and *V. vinifera* whatever the accessions used seems high. This kind of bias could have an impact on the efficiency of the introgression by potentially reducing the number of individuals with interesting traits, when the favourable allele determining a trait is in coupling with the weakly transmitted region. In addition to species-related distortions, our results also show that specific interactions between accessions may

unpredictably arise in a particular cross and create a strong distortion, as observed on chromosome 13 of the BC1 hybrid map.

In interspecific backcrosses, alleles from the recurrent parent are expected to be favoured over alleles from the donor parent [34]. Surprisingly, we observed that in homeologous distorted regions, *M. rotundifolia* alleles were not systematically eliminated in favour of *V. vinifera* alleles (Fig 2). For instance, *M. rotundifolia* alleles were preferentially conserved on chromosomes 1 and 13 whereas they were preferentially eliminated on chromosomes 11 and 15. Conservation of donor alleles in a recurrent background was already observed in other interspecific backcrosses and pseudo-backcrosses [34, 40-41]. Myburg *et al.* [34] explained this phenomenon by “the alleviation of genetic load by donor alleles in the recurrent genetic backgrounds”, i.e. the increase of fitness in hybrids. Rieseberg *et al.* [42] gave an alternative explanation involving the existence of “selfish” genes “that enhance the success of gametes they inhabit even if they pose a significant fitness cost during the diploid phase of the life cycle”.

BC1 population provided an interesting case to study segregation distortion. Initially composed of 177 individuals, its size was dramatically reduced through the years due to developmental abnormalities which increased after establishment in the vineyard. SSR data acquired on seedlings initially grown in the greenhouse allowed us to compare segregation distortions before and after size reduction (S4 Table) and to distinguish three different cases: i) segregation distortion was already present in SSR data acquired on seedlings and stayed stable after population size reduction, as observed on chromosome 15; ii) segregation distortion was not present in data acquired on seedlings but appeared after population size reduction, as observed on chromosome 13; iii) segregation distortion was present in data acquired on seedlings but evolved by increasing (chromosomes 4 and 11) or decreasing (chromosome 1) after population size reduction. Several causes can be associated to the first case of distortion: issues during gametogenesis, fertilization or seed germination. In the second case, the distortion is caused by developmental and abiotic stress leading to the death of plants after establishment in the vineyard, and most likely the distorted regions are involved in sustaining those stresses. The third case combines both causes: alleles or genotypes favoured during gametogenesis, fertilization or germination were either favoured again after establishment in the vineyard or eliminated.

In BC2 population, both maps, *V. vinifera* and hybrid, displayed distortion of segregation on the same chromosomes (chromosomes 4, 6, 8 and 18). These clusters were located either in a homologous region (chromosomes 4 and 18) or in a homeologous one, where *M. rotundifolia* alleles were either eliminated (chromosome 6), or favoured (chromosome 8). We assume that post-zygotic lethal interactions occurred between alleles of the two parents, influencing the viability of zygotes, the germination rate of seeds or the seedling survival. This phenomenon, which has already been reported in other plant species [34], is thus not specific to grapevine.

Our results show that a special attention has to be given to regions harbouring unbalanced segregations, particularly to species-related distortions. Indeed, by favouring some alleles or genotypes at the expense of others, segregation distortion impacts qualitatively and quantitatively the introgression of interesting or unfavourable traits. Some interesting alleles may be lost quickly if they are in a region preferentially eliminated. Moreover, if these alleles are present in few individuals, the probability to have interesting genotypes with a desired combination of traits is low.

Recombination suppression in homeologous regions

The difference in recombination rate observed between populations is the most surprising result of our study (Fig 4). In the BC1 hybrid map, recombination pattern was similar to that of the BC1 *V. vinifera* map, except for chromosome 7. Genetic distances were conserved between both parental maps, even if variations of the ratio between genetic distance and physical distance were observed all

along the chromosomes. Conversely, in the BC2 and BC4 hybrid maps, recombination patterns were different from those of the *V. vinifera* maps: recombination is suppressed in homeologous regions and enhanced in homologous regions of recombined chromosomes.

In an F1 parent, all chromosome pairs are homeologous, i.e. associate one chromosome from *V. vinifera* to one chromosome from *M. rotundifolia*. The similar genetic distance between BC1 hybrid and *V. vinifera* maps can be explained by two phenomena. First, a failure to form at least one crossing-over between chromosomes of the same pair during meiosis may lead to sterility by creating unbalanced gametes [43-45]. During F1 meiosis, only cells with at least one crossing-over per chromosome are able to produce viable gametes and then, generate a progeny. Second, *V. vinifera* and *M. rotundifolia* have small chromosomes and, according to the mean distance of genetic linkage maps, only 1-2 recombinations occur per chromosome during meiosis. The similar size of the F1 and *V. vinifera* maps obtained in this study is probably the consequence of these two limitations: a minimum of one recombination per chromosome and a maximum of two recombinations per chromosome. Moreover, the distances between markers are conserved in both BC1 parental maps, which tends to indicate that the divergence between both species is stable along the genome, except the lower arm of chromosome 7, as discussed above.

In the 22-8-78 BC1 and 1771P BC3 hybrid parents, each pair of chromosome is composed of one chromosome from *V. vinifera* and one chromosome from their hybrid parent (F1 and BC2) introgressed with a variable-length segment from *M. rotundifolia*, according to the individuals, i.e. some parts of their genome are homologous, while some others remain homeologous (Fig 1). We observed that recombination rate in 22-8-78 BC1 and 1771P BC3 meiosis depended on the level of introgression. When the chromosome was entirely inherited from *M. rotundifolia*, it behaved as in the 8624 F1 meiosis: the recombination events occurred along the chromosome as expected in intraspecific crosses (Fig 4), leading to a linkage map with genetic distances similar to *V. vinifera*. When the pairs of chromosomes are composed of both homologous and homeologous regions, recombination occurs preferentially in homologous regions rather than in homeologous regions. This recombination suppression in homeologous regions in interspecific hybrids has already been observed in tomato [46], lettuce [47], barley [48] and cotton [49]. Plant material used in these studies were introgression lines or substitution lines selected for their unique introgressed region. Canady *et al.* [46] established that recombination suppression observed in tomato is not due to chromosomal rearrangements and proposed as a cause the lack of sequence identity. As discussed above, macrosynteny between *M. rotundifolia* and *V. vinifera* is conserved but sequence divergence between the two genomes is substantial [31]. Thus, sequence divergence could explain the recombination suppression observed in our crosses. Regarding the distribution of recombination, according to Kauppi *et al.* [50], it can be explained by three reasons: 1) “the balance between the need for recombination and the need to minimize the breakdown of favourable haplotypes”, 2) “the facilitation of the optimal mechanical/biochemical function of chiasmata in chromosome segregation”, 3) “the efficiency of the region to repair”. Moreover, several studies have shown that DNA mismatch repair system restricted homeologous recombination in model systems, such as yeast [51] and Arabidopsis [52].

In addition, we observed that the recombination suppression was more important when the proportion of homeologous region on a given chromosome was lower than a threshold estimated to 80-85% and seemed total under 10%. Here, we first report about the effect on recombination of variable-length introgressed regions. Our results highlight that the behaviour at meiosis in terms of crossovers of each chromosome pair depends on its proportion of homeologous region and is unrelated to the behaviour of the other chromosome pairs.

Interestingly, in our study, even if recombination is suppressed in homeologous regions, total genetic length of each chromosome is conserved between *V. vinifera* and hybrid maps whatever the backcross level and the proportion of homeologous region. The higher recombination rate in

homologous regions balances the lack of recombination in homeologous regions. Consequently, at a chromosome scale, the presence of a homeologous segment amplifies recombination in the remaining homologous region. Analysis of allotriploids in *Brassicas* led Pele *et al.* [53] to similar conclusions. As observed in the F1 meiosis, the need for at least one recombination on the chromosome to produce viable gamete is probably responsible for this offsetting mechanism.

Conclusion

Our results bring new insight to address and overcome the difficulties met in the exploitation of wild species through interspecific crosses in grape breeding. In particular, phenomena uncovered about the behaviour of homeologous regions in various genetic contexts open concrete and practical perspectives to make the introgression process more effective. Interspecific recombination being optimal during F1 meiosis, the BC1 progeny is the crucial stage to identify the individuals which display the most favourable recombination pattern, i.e. carrying the targeted genetic factor of interest surrounded by an as small as possible homeologous region.

Materials and methods

Plant material

Three pseudo-backcross (BC) populations derived from two sources of *M. rotundifolia* were used in this study. A BC1 mapping population of 68 individuals was obtained from the cross between 8624 ((*V. vinifera* cv. Carignan x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) x *M. rotundifolia* cv. Trayshed) as female parent and *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon as pollen donor. A BC4 mapping population of 79 individuals, derived from the BC1 by three consecutive pseudo-backcrosses, was then obtained from the cross between 1771P ((BC1 x *V. vinifera* cv. Barbera) x *V. vinifera* cv. Tempranillo) and *V. vinifera* cv. Nebbiolo. A BC2 mapping population of 248 individuals was obtained from a cross between 22-8-78 ((*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon x *V. vinifera* cv. Alicante Bouschet) x *M. rotundifolia* cv. NC184-4) x [(*V. vinifera* cv. Mourvèdre x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) x *V. vinifera* cv. Pinot meunier]) as female parent and *V. vinifera* cv. Syrah as pollen donor.

SSR marker and GBS analyses

Genomic DNA was extracted from 80 mg of young expanding leaves using the Qiagen DNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) as described by the supplier. Microsatellite (SSR) analysis was performed as described in Blasi *et al.* [13]. DNA samples following quality prerequisites were sent to the Genomic Diversity Facility at the Institute of Biotechnology of Cornell University (Ithaca, NY, USA) where GBS analysis, sequence alignment to *V. vinifera*'s reference genome (PN40024 12Xv2; https://urgi.versailles.inra.fr/jbrowse/gmod_jbrowse/?data=myData%2Fvitis%2Fdata_gff&loc=chr1%3A9694432..14541139&tracks=Vitis%20vinifera%20cv.PN40024%20assembly%2012XV2%2CCRIBI_V1%2CREPET_TE%2Ccaffolds%2CSNP_Discovery_Vitis_vinifera&highlight=) and SNP calling were achieved. The reference-based pipeline used for bioinformatics analysis was the 'discovery' pipeline described in TASSEL 3.0 documentation and in Glaubitz *et al.* [54].

Genetic mapping

SNP markers obtained by GBS were filtered to only keep the most informative and reliable markers. The first step consisted in cleaning the data. For each genotype, SNPs with read depth (DP) lower than 4 or allelic depths (AD) for the reference and alternate alleles lower than 2 were set as missing data.

Then, for each population of backcross, SNP markers were eliminated if: 1) they had more than 5% of missing data in the population, 2) their segregation in the population was strictly identical to the segregation of another SNP, 3) the origin of their segregation was unknown because genotypes of both parents were missing, 4) they did not segregate in the population because both parents were homozygous. The goodness-of-fit between observed and expected Mendelian ratios was analysed for each marker locus using a χ^2 -test. Markers showing segregation distortion (p-value < 0.05) were not included in the final maps. The same filters were applied to SSR markers.

Parental genetic linkage maps were established for each population. We distinguish the maps of the F1, BC1 and BC3 parents, called hybrid maps from the maps of the *V. vinifera* parents, called *V. vinifera* maps. Distribution of markers in linkage groups and phase analysis was performed with JoinMap 3.0 [55]. The threshold value of logarithm of odd (LOD) score was set at 3.0 to claim linkage between markers. Linkage analysis was then performed with the R/qtl package of the R software (version 3.3.2, © 2016 The R Foundation for Statistical Computing) [56]. Linkage groups were numbered according to the reference genome [57].

A coverage rate was calculated for each chromosome as the ratio of physical distance between distal mapped markers on the total physical chromosome length. A contraction rate, allowing to link genetic distance and physical size, was also calculated per chromosome as:

$$C = \frac{Dg}{Dp} \times 300\,000$$

where *Dg* is the genetic distance in cM between the two distal markers, *Dp* the physical distance in bp between the same two markers and 300 000 an arbitrary conversion factor between centimorgans and base pairs. Calculated in this way, the contraction rate of the framework reference linkage map published by Doligez *et al.* [33] is 0.9.

Chromosome painting

The aim of chromosome painting is to identify introgressed regions remaining in each BC individual thanks to SNPs detected in *M. rotundifolia*. Illumina resequencing data were available for seven *M. rotundifolia* cultivars: Trayshed, Fry, Carlos, Dulcet, Regale, Yuga x Carlos and Michaux. Resequencing datasets were deposited under DOI 10.15454/1.5009976984187844E12 and are available through the following web page: <https://urgi.versailles.inra.fr/Projects/Achieved-projects/Muscares>. They will be made available through the EMBL database for final publication. For BC1 and BC4 populations, both derived from Trayshed, chromosome painting was performed with the Trayshed data. *M. rotundifolia* parent of the BC2 population being not available, resequencing data from all the seven *M. rotundifolia* accessions were used for the analysis.

First, SNPs from *M. rotundifolia* that could be found in the offspring were determined. Illumina reads from the seven accessions of *M. rotundifolia* were aligned against the *V. vinifera* reference genome (PN40024 12Xv2), using the alignment gsnap software [59]. We performed the analysis using the following parameters: --batch=4, --npaths=3, --max-mismatches=12. Reads were then parsed with an Edit Distance of 15, and we retained only the alignments that were paired and that matched with a unique location on the reference genome. SNPs from these reads were called, using the default parameters for SAMtools mpileup [60], followed by bcftools, as described on the SAMtools webpage (<http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>) and with the following settings: --multiallelic-caller, --skip-variants=Indel and --pval-threshold=1. SNP calling for *M. rotundifolia* accessions was performed at the same positions than those provided in the GBS vcf file, and a vcf file was generated for each accession. Data were then cleaned for their quality: QUAL score lower than 30, DP score lower than 4 or higher than 25 were considered as missing data. A pool of *M. rotundifolia* SNPs was established using each position with at least one alternative allele in Trayshed, for BC1 and BC4, or in one of the 7 cultivars, for the BC2.

Second, SNPs from *M. rotundifolia* identified in the previous step were searched in the offspring. After eliminating the positions with missing data, SNPs that were actually present were determined for each individual of each population. These SNPs were heterozygous and had one allele from *M. rotundifolia*.

Finally, a rate of the SNPs coming from *M. rotundifolia* was calculated on sliding windows of 20 consecutive SNPs as:

$$\tau_i = \frac{Nr_i}{Np_i}$$

where τ_i was the rate of SNPs coming from *M. rotundifolia* for the window i , Np_i the potential number of SNPs from *M. rotundifolia* that could be found in the window i , Nr_i the real number of SNPs from *M. rotundifolia* detected in the window i . The window was slid of 1 SNP. A threshold of τ_i , beyond which the region was assigned to *M. rotundifolia*, was fitted for each population according to the BC level and the quality of the data to balance the chance to detect a false homeologous region and the chance not to detect a true homeologous region.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Fondation Jean Poupelain for funding our work through the HealthyGrape2 program. This work was also partially funded by the French “Agence Nationale de Recherche” (ANR-08-GENM-007). We are grateful to E. Duchêne for useful discussions on R scripts. We thank, V. Dumas and J. Misbach for excellent assistance in plant maintenance and growing.

References

- [1] Hajjar R, Hodgkin T. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*. 2007; 156: 1-13.
- [2] Brar DS, Khush GS. Alien introgression in rice. In: Sasaki T, Moore G, editors. *Oryza: From Molecule to Plant*. Netherlands: Springer; 1997. pp. 35-47.
- [3] Atlagić J. Roles of interspecific hybridization and cytogenetic studies in sunflower breeding. *Helia*. 2004; 27: 1-24.
- [4] Bradshaw JE, Ramsay G. Utilisation of the Commonwealth Potato Collection in potato breeding. *Euphytica*. 2005; 146: 9-19.
- [5] Garg H, Banga S, Bansal P, Atri C, Banga SS. Hybridizing *Brassica rapa* with wild crucifers *Diplotaxis eruroides* and *Brassica maurorum*. *Euphytica*. 2007; 156: 417-424.
- [6] Wulff BB, Moscou MJ. Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Front Plant Sci*. 2014; 5: 692.
- [7] Singh RJ, Nelson RL. Intersubgeneric hybridization between *Glycine max* and *G. tomentella*: production of F1, amphidiploid, BC1, BC2, BC3, and fertile soybean plants. *Theor Appl Genet*. 2015; 128: 1117-1136.
- [8] Boubals D. Étude de la distribution et des causes de la résistance au phylloxera radicole chez les Vitacées. *Ann Amélior Plantes*. 1966; 16: 145-184.
- [9] Cadle-Davidson L. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Plant Dis*. 2008; 92: 1577-1584.

- [10] Cadle-Davidson L, Chicoine DR, Consolie NH. Variation within and among *Vitis* spp. for foliar resistance to the powdery mildew pathogen *Erysiphe necator*. *Plant Dis.* 2011; 95: 202-211.
- [11] Marguerit E, Boury C, Manicki A, Donnart M, Butterlin G, Némorin A, et al. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor Appl Genet.* 2009; 118: 1261-1278.
- [12] Zhang J, Hausmann L, Eibach R, Welter LJ, Töpfer R, Zyprian EM. A framework map from grapevine V3125 (*Vitis vinifera* 'Schiava grossa'×'Riesling') × rootstock cultivar 'Börner' (*Vitis riparia* × *Vitis cinerea*) to localize genetic determinants of phylloxera root resistance. *Theor Appl Genet.* 2009; 119: 1039-1051.
- [13] Blasi P, Blanc S, Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Rühl EH, Mestre P, et al. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theor Appl Genet.* 2011; 123: 43-53.
- [14] Riaz S, Tenscher AC, Ramming DW, Walker MA. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theor Appl Genet.* 2011; 122: 1059-1073.
- [15] Schwander F, Eibach R, Fechter I, Hausmann L, Zyprian E, Töpfer R. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor Appl Genet.* 2012; 124: 163-176.
- [16] Pap D, Riaz S, Dry IB, Jermakow A, Tenscher AC, Cantu D, et al. Identification of two novel powdery mildew resistance loci, *Ren6* and *Ren7*, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biol.* 2016; 16: 170.
- [17] Bouquet A. Resistance to grape fanleaf virus in muscadine grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Dis.* 1981; 65: 791-793.
- [18] Olmo HP. The potential role of (*vinifera* × *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. *Cell Mol Life Sci.* 1986; 42: 921-926.
- [19] Goldy RG, Onokpise OU. Genetics and breeding. In: Basiouny FM, Himelrick DG, editors. *Muscadine grapes*. Alexandria: ASHS Press; 2001. pp. 51-90.
- [20] Ruel JJ, Walker MA. Resistance to Pierce's disease in *Muscadinia rotundifolia* and other native grape species. *Am. J. Enol. Vitic.* 2006; 57: 158-165.
- [21] Detjen LR. The limits in hybridization of *Vitis rotundifolia* with related species and genera. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin.* 1919; 17: 5-26.
- [22] Bouquet A. *Vitis* × *Muscadinia* hybridization: A new way in grape breeding for disease resistance in France. *Proc. 3rd Intl. Symp. on Grape Breeding.* 1980. pp. 42-61.
- [23] Pauquet J, Bouquet A, This P, Adam-Blondon AF. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor Appl Genet.* 2001; 103: 1201-1210.
- [24] Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, Butterlin G, et al. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Hort.* 2003; 603: 451-456.
- [25] Barker CL, Donald T, Pauquet J, Ratnaparkhe MB, Bouquet A, Adam-Blondon AF, et al. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor Appl Genet.* 2005; 111: 370-377.

- [26] Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Coste P, Dumas V, Butterlin G, Bouquet A, et al. Genetic analysis of resistance to downy mildew from *Muscadinia rotundifolia*. 9th International Conference on Grape genetics and Breeding, Udine, Italie; 2006.
- [27] Blanc S, Wiedemann-Merdinoglu S, Dumas V, Mestre P, Merdinoglu D. A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theor Appl Genet*. 2012; 125: 1663-1675.
- [28] Feechan A, Anderson C, Torregrosa L, Jermakow A, Mestre P, Wiedemann-Merdinoglu S, et al. Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. *Plant J*. 2013; 76: 661-674.
- [29] Patel GI, Olmo HP. Cytogenetics of *Vitis*: I. The hybrid *V. vinifera* × *V. rotundifolia*. *Am J Bot*. 1955; 42: 141-159.
- [30] Jelenkovic G, Olmo HP. Cytogenetics of *Vitis*. III. Partially fertile F1 diploid hybrids between *V. vinifera* L. and *V. rotundifolia* Michx. *Vitis*. 1968; 7: 281-293.
- [31] Wan Y, Schwaninger HR, Baldo AM, Labate JA, Zhong GY, Simon CJ. A phylogenetic analysis of the grape genus (*Vitis* L.) reveals broad reticulation and concurrent diversification during neogene and quaternary climate change. *BMC Evol Biol*. 2013; 13: 141.
- [32] Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One*. 2011; 6: e19379.
- [33] Doligez A, Adam-Blondon AF, Cipriani G, Di Gaspero G, Laucou V, Merdinoglu D, et al. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theor Appl Genet*. 2006; 113: 369-382.
- [34] Myburg AA, Vogl C, Griffin AR, Sederoff RR, Whetten RW. Genetics of postzygotic isolation in *Eucalyptus*: whole-genome analysis of barriers to introgression in a wide interspecific cross of *Eucalyptus grandis* and *E. globulus*. *Genetics*. 2004; 166: 1405-1418.
- [35] Kullan ARK, van Dyk MM, Jones N, Kanzler A, Bayley A, Myburg AA. High-density genetic linkage maps with over 2,400 sequence-anchored DArT markers for genetic dissection in an F2 pseudo-backcross of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*. *Tree Genet. Genomes*. 2012; 8: 163-175.
- [36] Brennan AC, Hiscock SJ, Abbott RJ. Interspecific crossing and genetic mapping reveal intrinsic genomic incompatibility between two *Senecio* species that form a hybrid zone on Mount Etna, Sicily. *Heredity*. 2014; 113: 195-204.
- [37] Liu S, Li Y, Qin Z, Geng X, Bao L, Kaltenboeck L, et al. High-density interspecific genetic linkage mapping provides insights into genomic incompatibility between channel catfish and blue catfish. *Anim Genet*. 2016; 47: 81-90.
- [38] Adam-Blondon AF, Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D, This P. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor Appl Genet*. 2004; 109: 1017-1027.
- [39] Troggio M, Malacarne G, Coppola G, Segala C, Cartwright DA, Pindo M, et al. A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics*. 2007; 176: 2637-2650.
- [40] Jiang CX, Chee PW, Draye X, Morrell PL, Smith CW, Paterson AH. Multilocus interactions restrict gene introgression in interspecific populations of polyploid *Gossypium* (cotton). *Evolution*. 2000; 54: 798-814.

- [41] Lacape JM, Nguyen TB, Thibivilliers S, Bojinov B, Courtois B, Cantrell RG, et al. A combined RFLP SSR AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome*. 2003; 46: 612-626.
- [42] Rieseberg LH, Baird SJ, Gardner KA. Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Mol Biol*, 2000; 42: 205-224.
- [43] Li W, He C, Freudenberg J. A mathematical framework for examining whether a minimum number of chiasmata is required per metacentric chromosome or chromosome arm in human. *Genomics*. 2011; 97: 186-192.
- [44] Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M. The molecular biology of meiosis in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2015; 66: 297-327.
- [45] Dumont BL. Variation and evolution of the meiotic requirement for crossing over in mammals. *Genetics*. 2017; 205: 155-168.
- [46] Canady MA, Ji Y, Chetelat RT. Homeologous recombination in *Solanum lycopersicoides* introgression lines of cultivated tomato. *Genetics*. 2006; 174: 1775-1788.
- [47] den Boer E, Zhang NW, Pelgrom K, Richard G, Visser F, Niks RE, et al. Fine mapping quantitative resistances to downy mildew in lettuce revealed multiple sub-QTLs with plant stage dependent effects reducing or even promoting the infection. *Theor Appl Genet*. 2013; 126: 2995.
- [48] Johnston PA, Niks RE, Meiyalaghan V, Blanchet E, Pickering R. *Rph22*: mapping of a novel leaf rust resistance gene introgressed from the non-host *Hordeum bulbosum* L. into cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet*. 2013; 126: 1613.
- [49] Zheng X, Hoegenauer KA, Quintana J, Bell AA, Hulse-Kemp AM, Nichols RL, et al. SNP-Based MAS in Cotton under Depressed-Recombination for *Ren^{lon}*-Flanking Recombinants: Results and Inferences on Wide-Cross Breeding Strategies. *Crop Sci*. 2016; 56: 1526-1539.
- [50] Kauppi L, Jeffreys AJ, Keeney S. Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet*. 2004; 5: 413-424.
- [51] Hunter N, Chambers SR, Louis EJ, Borts RH. The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *EMBO J*, 1996; 15: 1726.
- [52] Li L, Jean M, Belzile F. The impact of sequence divergence and DNA mismatch repair on homeologous recombination in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2006; 45: 908-916.
- [53] Pelé A, Falque M, Trotoux G, Eber F, Nègre S, Gilet M, et al. Amplifying recombination genome-wide and reshaping crossover landscapes in *Brassicac*s. *PLoS Genet*. 2017; 13: e1006794.
- [54] Glaubitz JC, Casstevens TM, Lu F, Harriman J, Elshire RJ, Sun Q, et al. TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS One*. 2014; 9: e90346.
- [55] Van Ooijen JW, Voorrips RE. JoinMap® 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research Int. 2001.
- [56] Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 2003; 19: 889-890.
- [57] Jaillon O, Aury J M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 2007; 449: 463-467.
- [58] Wu TD, Nacu S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*. 2010; 26: 873-881.

[59] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25: 2078-2079.

Supporting information captions

S1 Fig. Parental maps of the BC1 (a), BC4 (b) and BC2 (c) populations.

S2 Fig. Evolution of the segregation distortion along the chromosomes of the hybrid parents of the BC1 (a) and BC2 (b) populations and of the *V. vinifera* parent of the BC2 population (c).

S1 Table. Number of individuals genotyped by GBS and with SSRs in each mapping population.

S2 Table. Covering rates of the chromosomes of the parental maps of the BC1, BC2 and BC4 populations.

S3 Table. Contraction rates of the chromosomes of the parental maps of the BC1, BC2 and BC4 populations.

S4 Table. Segregation distortion of eight SSR markers on BC1 hybrid map before and after population size reduction.

3. Conclusion

L'étude de la variation du taux de recombinaison le long du génome et de la transmission des régions issues de *M. rotundifolia* dans la descendance de croisements avec *V. vinifera* nous apporte de nombreuses informations sur la génétique des croisements.

La variation du taux de recombinaison en fonction de la population étudiée et du niveau d'homéologie des chromosomes est particulièrement intéressante. Il apparaît que les paires de chromosomes contenant uniquement des régions homologues ou uniquement des régions homéologues possèdent des taux de recombinaison similaires à ceux observés lors de croisements intraspécifiques chez *V. vinifera*, quelle que soit la population étudiée. Le chromosome 7 fait cependant exception à cette règle avec une chute du taux de recombinaison dans sa partie inférieure, correspondant au chromosome 20 de *M. rotundifolia*. Dans cette région, la différence entre les deux espèces est probablement trop importante pour permettre aux deux génomes de recombiner. À l'inverse, les paires de chromosomes contenant à la fois des régions homologues et des régions homéologues montrent des variations importantes du taux de recombinaison : peu ou pas de recombinaisons ont lieu dans les régions homéologues alors que les régions homologues affichent plus de recombinaisons que ce que l'on peut observer dans un croisement intraspécifique. Du fait des contraintes liées au nombre minimal d'une recombinaison obligatoire pour la réussite de la méiose, les régions homologues compensent l'absence de recombinaison dans les régions homéologues. Ces résultats donnent de précieuses informations quant à la stratégie de sélection à adopter. Lors de l'introgession, il est nécessaire d'éliminer les régions issues de *M. rotundifolia* proches des locus d'intérêt dès le croisement donnant lieu à la génération BC1. En effet, lors de la méiose de l'hybride F1, toutes les paires de chromosomes étant entièrement constituées de régions homéologues, les recombinaisons interspécifiques ont lieu à la même fréquence que les recombinaisons intraspécifiques chez un individu *V. vinifera*. La probabilité d'obtenir des individus ayant recombiné autour du locus d'intérêt est donc plus grande dans la population de BC1. L'élimination des régions issues de *M. rotundifolia* sur les autres chromosomes peut être réalisée lors des croisements suivants, la transmission de ces régions étant essentiellement de type tout ou rien.

Certaines régions issues de *M. rotundifolia* sont préférentiellement conservées ou éliminées quel que soit le croisement ou la variété de *M. rotundifolia* initialement utilisée. Ainsi, sur le chromosome 1, les allèles de *M. rotundifolia* sont conservés chez 60 % à 70 % des individus des populations de BC1 et BC2, alors que, sur le chromosome 11, ils ne sont conservés que chez 10 % à 30 % des individus. De tels biais dans la ségrégation sont source de perte de diversité dans les populations de backcross. Certaines combinaisons alléliques peuvent n'être présentes qu'en faible proportion et aussi bien l'élimination que la conservation de certains caractères peuvent être entravées. Sachant cela, connaître le déterminisme génétique des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* s'avère être essentiel pour faciliter leur conservation ou leur élimination.

Chapitre IV :
Étude comparative
des caractères phénologiques et
morphologiques de *Vitis vinifera*
et *Muscadinia rotundifolia*

IV. Étude comparative des caractères phénologiques et morphologiques de *Vitis vinifera* et *Muscadinia rotundifolia*

1. Introduction

Bien que *M. rotundifolia* soit une espèce cultivée très appréciée dans le sud-est des États-Unis, elle possède des caractéristiques organoleptiques inadaptées à la viticulture européenne, telles que son goût foxé. De plus, certaines caractéristiques culturelles, comme sa sensibilité au froid, limitent son utilisation. Il est donc primordial d'éliminer ces caractères défavorables lors de l'introggression, pour le développement de nouvelles variétés de vigne. En outre, l'utilisation des hybrides producteurs directs au début du XX^{ème} siècle a donné une mauvaise image aux espèces américaines et aux variétés issues de croisements interspécifiques. Ainsi, la présence de caractères spécifiques des espèces américaines dans une variété risque de fortement freiner son utilisation dans les vignobles français. Dans ce contexte, l'identification des caractères phénologiques et morphologiques spécifiques de *M. rotundifolia* apparaît nécessaire afin de s'assurer de leur élimination lors de l'introggression. Par ailleurs, outre la résistance aux maladies, *M. rotundifolia* est susceptible de porter des caractères intéressants à introgresser chez *V. vinifera*.

L'introggression des caractères de résistance a été fortement améliorée grâce à l'utilisation de la sélection assistée par marqueurs (SAM). Le développement de marqueurs génétiques accolés aux facteurs de résistance permet de sélectionner de façon simple et robuste, dès le stade plantule, les individus d'une population porteurs de la résistance, sans avoir recours au phénotypage. Les caractères exprimés par les jeunes plantes sont considérés comme stabilisés trois ans après le semis, année à partir de laquelle les plants sont généralement fertiles. De plus, selon leur héritabilité, les caractères phénotypiques sont plus ou moins sensibles aux conditions environnementales. Il est donc recommandé de répéter les mesures plusieurs années de suite. Ainsi, le développement de marqueurs génétiques associés aux caractères phénologiques et morphologiques peut raccourcir l'intervalle entre deux générations et donc accélérer le processus d'introggression et le retour à un phénotype *V. vinifera*. La mise au point de tels marqueurs nécessite de connaître le déterminisme génétique des caractères étudiés.

Cette étude a été menée dans l'objectif d'identifier les caractères spécifiques de *M. rotundifolia* et leur déterminisme génétique, et a fait l'objet d'un manuscrit intitulé « Comparative analysis of *Vitis vinifera* and *Muscadinia rotundifolia* for traits related to phenology, and morphology and genetic control of *M. rotundifolia*'s specific traits » présenté ci-après. Dans un premier temps, différentes accessions de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* ont été comparées afin d'identifier les caractères spécifiques de *M. rotundifolia*. La comparaison a porté sur la phénologie, dates de débourrement, de floraison et de véraison, et sur la morphologie de la feuille, du rameau, du sarment, du bourgeon, de l'inflorescence et de la baie. Le déterminisme génétique des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* a été établi, dans un second temps, grâce à l'analyse des populations de backcross. Les données supplémentaires de l'article sont présentées dans l'Annexe 2.

2. Comparative analysis of *Vitis vinifera* and *Muscadinia rotundifolia* for traits related to phenology and morphology, and genetic control of *M. rotundifolia*'s specific traits

DELAME M.^{1,2}, GAZON M.¹, DUMAS V.¹, DUCHENE E.¹, MERDINOGLU D.¹

¹Université de Strasbourg, INRA, SVQV UMR-A 1131, F-68000 Colmar, France, ²AgroParisTech, Direction des Formations Doctorales, 19 avenue du Maine, 75015 Paris, France.

Abstract

Muscadinia rotundifolia, an American species related to the European grapevine *Vitis vinifera*, displays a high level of resistance to grapevine diseases. However, *M. rotundifolia* flavour and cultural characteristics are not adapted to French wine production. Moreover, French-American hybrid grapes have a poor image and cannot be cultivated to produce labelled wines. Backcross-based introgression has been used in French breeding programs to transfer resistance factors from *M. rotundifolia* into cultivated genetic backgrounds while eliminating the *M. rotundifolia*'s traits, and in particular, the unwanted cultural traits and off-flavours. Knowing the genetic determinism of the traits specific to *M. rotundifolia* will help the development of marker assisted selection and improve the elimination of these traits during crosses. To this end, morphology and phenology of several accessions of *V. vinifera* and *M. rotundifolia* were, first, compared to identify traits specific to *M. rotundifolia*. Of the 31 traits showing features specific to *M. rotundifolia*, 19 traits were highly specific. Second, three mapping populations were generated by pseudo-backcrosses using *M. rotundifolia* as the donor parent and several *V. vinifera* cultivars as the recurrent parents. Genetic determinism of traits specific to *M. rotundifolia* was established using high density genetic linkage maps mainly based on SNPs. We detected 66 QTLs for 16 traits throughout the three populations. Few QTLs were stable in different environments or populations. Four QTLs were found to be located near the loci of resistance to downy and powdery mildew, *Rpv1/Run1*, but far enough to have recombination between the two regions. On the contrary, one QTL is located in the region of *Rpv2* and *Run2*. However, with our study, we can conclude that no major unwanted trait is controlled by a QTL near resistance gene, and thus they will be easily eliminated during backcrosses.

Introduction

Since the 19th century, European viticulture has been completely modified by the introduction of several pests and diseases from North America. The main agents are the Ascomycete *Erysiphe necator* and the Oomycete *Plasmopara viticola*, causing respectively powdery and downy mildew, and the aphid *Daktulosphaira vitifoliae*. Most of the varieties of *Vitis vinifera*, the European cultivated grapevine, are susceptible to these pests. Several resistance factors were found in Asian and American *Vitis* species related to grapevine such as *V. riparia* (Marguerit *et al.*, 2009), *V. amurensis* (Blasi *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2012) and *V. piasezki* (Pap *et al.*, 2016). *Muscadinia rotundifolia*, a North American grapevine also related to *V. vinifera*, is highly resistant to major grapevine pathogens. Several factors providing resistance to powdery and downy mildew have already been identified in *M. rotundifolia* (Merdinoglu *et al.*, 2003; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006; Blanc *et al.*, 2012; Pauquet *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2005; Riaz *et al.*, 2011). This species is also resistant to some other pathogens causing severe damages such as *Guignardia bidwellii*, responsible for black-rot disease, nematodes of

the genus *Xiphinema*, vectors for viruses, and *Xylella fastidiosa*, responsible for Pierce's disease (Bouquet, 1981; Olmo, 1986; Ruel & Walker, 2006).

Besides *M. rotundifolia* is cultivated in the United States to produce jams, juices and wine, it is not adapted to European wine production because of its foxy flavour. The use at the beginning of the 20th century of French-American hybrid grapes and their prohibition later left deep scars. Varieties originated from an interspecific cross with American grapes have a poor image and cannot be cultivated to make labelled wines in France. Moreover, unwanted cultural traits and off-flavours need to be eliminated. Thus, backcross-based introgression has been used to transfer resistance factors into cultivated backgrounds while eliminating the *M. rotundifolia*'s traits, and in particular the unwanted cultural traits and off-flavours.

There is a lack of study establishing which traits are specific to *M. rotundifolia*. Such traits, even if they are not related to cultural ability or flavour, could hamper the spread of new resistant varieties. Several studies analysed *V. vinifera* and *M. rotundifolia* morphology but only some of them briefly compared the two species (Bouquet, 1980; Patel & Olmo, 1955). Factors giving resistance were strongly studied and marker assisted selection was developed to improve breeding programs. On the contrary, genetic determinism of morphological traits from *M. rotundifolia* was poorly studied and some traits such as berry traits need several years to be observed, slowing selection programs. Moreover, knowing the genetic determinism of traits specific to *M. rotundifolia* will show factor co-localization. In some cases, these co-localizations may have a negative impact on the introgression. If a factor controlling a *M. rotundifolia*'s trait is located near a resistance gene, it may be hard to separate them during the introgression.

Several genetic linkage maps of pseudo-backcross populations have already been established to discover resistance genes in *M. rotundifolia* (Riaz *et al.*, 2011; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006). However, high density genetic linkage maps are a tool to improve the precision of the QTL detection. Today, next-generation sequencing allows the development of such linkage maps. Genotyping-by-sequencing (GBS) appears to be a simple robust procedure allowing the discovery of thousands of markers for hundreds of individuals, rapidly and at low cost (Elshire *et al.*, 2011). Using this technic, a SNP genetic linkage map has already been established to identify resistance and susceptibility genes to powdery mildew in the interspecific cross (*V. vinifera* x *V. rupestris*) (Barba *et al.*, 2014). Recently, GBS has been used to establish high density genetic linkage maps of interspecific crosses and backcrosses of *V. vinifera* with *M. rotundifolia* (Delame *et al.*, in prep.).

The purpose of this study is, first, to compare the morphology and phenology of *M. rotundifolia* to *V. vinifera* in order to identify traits specific to *M. rotundifolia*. Secondly, *M. rotundifolia* specific traits are studied in mapping populations to establish their genetic determinism. Genetic linkage maps of three backcross populations of different level were previously established using SNPs revealed by GBS and microsatellite markers. In this study, QTL detection of *M. rotundifolia* specific traits is performed thanks to these high density genetic linkage maps and to phenotypic data. Some QTLs were detected near previously identified resistance genes. These results will help breeders to adapt breeding programs. Indeed, they will be able to focus on more problematic traits and factors which have to be eliminated during introgression.

Material and methods

Plant material

To compare *V. vinifera* and *M. rotundifolia* characteristics, two groups of plant accessions of each species were used.

The *M. rotundifolia* group consisted of 24 accessions (Table 1). In this study, we wanted to focus on traits with a high level of heritability and plants were grown in two different conditions. 19

Table 1: List of accessions of *V. vinifera* and *M. rotundifolia* studied for species comparison

Accession	Location		Organs studied	
	Greenhouse	Vineyard	Leaf, shoot, bud	Flower, berry
<i>V. vinifera</i>				
Chaouch blanc	x		x	x
Kövidinka	x		x	x
Terret Bouschet	x		x	x
Riminèse	x		x	
Danugue	x		x	
Verdelho tinto female	x		x	
Frankenthal	x		x	
Alba imputotato	x		x	
Rosa menna di Vacca	x		x	
Pozsony feher	x		x	
Vidiano	x		x	
Dimrit	x		x	
Médouar	x		x	
Dureza	x		x	
Mireille	x			x
Kaisermuskat	x			x
Beregi rozsas	x			x
Urmi dinka	x			x
Alexandroouli	x			x
Tavkveri	x			x
Tibouren	x			x
Carignan	x	x	x	x
Sultanine	x	x	x	x
Muscat d'Alexandrie	x	x	x	x
Cabernet Sauvignon		x	x	x
Grenache		x	x	x
Pinot gris		x	x	x
Syrah		x	x	x
Tempranillo		x	x	x
Trollinger		x	x	x
Barbera		x	x	x
Nebbiolo		x	x	x
Kremovoï		x	x	x
Rannii		x	x	x
Karadjidji		x	x	x
Sourhak		x	x	x
<i>M. rotundifolia</i>				
Regale		x	x	x
Dulcet		x	x	x
Carlos		x	x	x
Yuga x Carlos		x	x	x
Unnamed		x	x	x
Unnamed_1	x		x	
Unnamed_2	x		x	
Unnamed_3	x		x	
Unnamed_4	x		x	
Unnamed_5	x		x	
Unnamed_6	x		x	
Unnamed_7	x		x	
Unnamed_8	x		x	
Unnamed_9	x		x	
Unnamed_10	x		x	
Unnamed_11	x		x	
Unnamed_12	x		x	
Unnamed_13	x		x	
Unnamed_14	x		x	
Unnamed_15	x		x	
Unnamed_16	x		x	
Unnamed_17	x		x	
Unnamed_18	x		x	
Unnamed_19	x		x	

accessions were grown ungrafted in the greenhouse and 5 accessions were grown ungrafted outside in two replicates. As *M. rotundifolia* is sensitive to frost, these five accessions were first grown in the greenhouse in 40 L pots and put outside on June 9th 2015, after flowering. Plants in the greenhouse were grown in 4 L pots, staked on 3 m nylon wires, on a substrate composed of 1/3 of perlite and 2/3 of sand, and watered daily with a complete nutritive solution ((1,5% Plantproducts® 17-10-30 N-P-K)).

The *V. vinifera* group consisted of 36 accessions (Table 1), 21 grown in the greenhouse, 12 grown in the vineyard and 3 grown in both environments. Accessions were chosen according to their geographical origins and the phylogenetic tree built by Bacilieri *et al.* (2013) in order to maximize diversity. The greenhouse accessions grown from cuttings were studied in a core collection of 279 accessions (Nicolas *et al.*, 2016) cultivated under the same technical itinerary described above for *M. rotundifolia*. The vineyard accessions were studied in an ampelographic collection of 204 accessions established since 2001 at INRA Colmar, France. Vines were trained at a planting density of 6,060 plants per ha with five replicates per accession and grafted on the Fercal 242 rootstock. All the organs were studied on the vineyard accessions, whereas, on the greenhouse accessions, either vegetative or reproductive parts or both were studied according to the plant development.

To study genetic determinism of traits specific to *M. rotundifolia*, three mapping populations generated by pseudo-backcrosses between *M. rotundifolia*, as donor parent, and several *V. vinifera* cultivars, as recurrent susceptible parents, were used. A pseudo-BC1 population of 68 individuals was obtained from the cross between 8624 (*V. vinifera* cv. Carignan x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) x *M. rotundifolia* cv. Trayshed) as female parent and *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon as pollen donor. A BC4 mapping population of 79 individuals was then obtained from the BC1 by three consecutive pseudo-backcrosses with different *V. vinifera* accessions, respectively, Barbera, Tempranillo and Nebbiolo. Finally, a pseudo-BC2 population of 221 individuals was obtained from the cross between 22-8-78 [(*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon x *V. vinifera* cv. Alicante Bouschet) x *M. rotundifolia* cv. NC184-4] x [(*V. vinifera* cv. Mourvèdre x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) x *V. vinifera* cv. Pinot meunier]) as female parent and *V. vinifera* cv. Syrah as pollen donor.

BC1 population was grown both in the greenhouse and in the vineyard. In the greenhouse, plants were grown using the same management practices as above. In vineyard, plants were trained on a vertical trellis, grafted on the Fercal 242 rootstock and planted at a planting density of 4,330 plants per ha, with 1-3 replicates per individuals according to plant survival. BC2 population was established in the same conditions (and the same vineyard) as BC1 population with two replicates per individual. Lastly, BC4 population was grown in the greenhouse.

Phenotyping

List of traits to be studied and evaluation scales were established according to Office International de la Vigne et du Vin descriptors (Anonymous, 2009), literature (Bouquet, 1980; Goffinet *et al.*, 2001; Patel & Olmo, 1955) and direct observations (Table S1). All the traits were observed on the *V. vinifera* and *M. rotundifolia* groups in 2015. Traits identified as specific were assessed on backcross populations and their parents in 2016.

Phenological stages were studied using heat sums (Duchêne *et al.*, 2010). To determine *M. rotundifolia*'s base temperature, the development of four shoots of *M. rotundifolia* and four shoots of *V. vinifera* was studied between April and June 2016, which covered a period from post-budburst to post-flowering. The number of leaves appeared in one week was plotted against the average temperature over the week. Base temperatures of each species were estimated as the intersection of the regression lines with the x-axis.

QTL analysis

High-density parental genetic maps were previously established using genotyping-by-sequencing for the three BC populations (Delame *et al.*, in prep.). For each population, two linkage maps were available, one for the female hybrid parent and one for the male *V. vinifera* parent. In each population, introgressed regions from *M. rotundifolia* were identified for the parents and for the

offspring. Genotypic effects used for QTL detection were determined using analysis of variance performed with the R software (version 3.3.2, © 2016 The R Foundation for Statistical Computing). Broad-sense heritability estimates were calculated as:

$$\hat{h}_L^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \hat{\sigma}_e^2} \text{ (Gallais, 1989)}$$

where $\hat{\sigma}_g^2$ is the genotypic variance and $\hat{\sigma}_e^2$ the residual variance, given by an analysis of variance.

QTL analysis was carried out by both marker-regression analysis and interval mapping, in the normal, binary or 2-part model depending on the traits, using the R/qtl package of the R software (Broman *et al.*, 2003). The significant LOD threshold for QTL detection at $\alpha=0.05$ was determined by 1,000 permutations of the phenotypic data. Maximum LOD values were used to estimate QTL peak positions and the confidence intervals of QTL peaks were determined as the peak flanking regions in which LOD scores decline by one LOD. A manual cofactor selection was then used in Multiple QTL Model analysis.

Results

Variability and specificity of M. rotundifolia

Morphological and phenological traits were studied throughout the year on 24 accessions of *M. rotundifolia* and 36 accessions of *V. vinifera* to compare the two species and identify traits specific to *M. rotundifolia*. This comparison leads us to distinguish two types of traits: those for which no overlapping between the variability of the two species is observed, so called highly specific traits ; and those for which some features are shared between the two species but at least one feature is specific to *M. rotundifolia*, so called partially specific traits. Out of the 118 traits studied, 19 traits are found to be highly specific and 12 traits partially specific. Specific trait ranges of *V. vinifera* and *M. rotundifolia* are shown in Table 2, Figure 1, Figure S1 and Figure S2.

Phenological traits were studied using the heat sums between February 15th and budburst, budburst and flowering, and flowering and veraison. Contrary to *V. vinifera*, base temperatures of *M. rotundifolia* for the different periods are unknown. By studying the growth speed of shoots of *V. vinifera* and *M. rotundifolia*, we were able to establish the base temperatures for the period between budburst and flowering as 10°C for *V. vinifera* and 11°C for *M. rotundifolia*. However, experimental procedure was not adapted to establish base temperatures for the other periods. According to Duchêne *et al.* (2010), base temperatures for *V. vinifera* are - 2°C for the period between February 15th and budburst, and 3°C for the period between flowering and veraison. In our study, we used the same bases for *M. rotundifolia*. Given the base temperatures, the heat sum values observed for the period between February 15th and budburst cover the same range in both species. On the contrary, heat sum ranges observed between budburst and flowering on one hand, and between flowering and veraison on the other hand, are clearly different between the two species : flowering and veraison occurred later for *M. rotundifolia* than for *V. vinifera*.

Some of the morphological traits studied here were already described as specific in the literature. The majority of these traits are found to be highly or partially specific in our results. *M. rotundifolia* shows simple tendrils, small leaves with one lobe, very wide open petiole sinus and low amount of teeth, lenticels on the wood and on the skin, no brush between pedicel and berry, and oblong seeds with transversal ridges on their dorsal side. In the literature, *M. rotundifolia* is known to be less hairy than *V. vinifera*. Our results confirm that assumption for some organs, such as young shoot tip and bud. Contrary to the literature, we do not observed specificity for two traits previously described as specific: the organization of the latent bud and the wood density. *M. rotundifolia* was observed as described in the literature, i.e. parallel leaf patterns of primary and secondary buds and wood density above 1. On the contrary, *V. vinifera* shows more variability than expected, i.e. leaf patterns of primary and secondary bud varied from perpendicular to parallel and wood density is either above or below 1.

Table 2: Ranges for specific traits in *V. vinifera* and *M. rotundifolia*. Pictures of all the traits specific to *M. rotundifolia* are given in Figure S1.

Trait	Trait name	Specificity	<i>M. rotundifolia</i> ranges	<i>V. vinifera</i> ranges
Flowering date (greenhouse)	Flo	highly	873 – 979 DD	610 – 769 DD
Veraison date (vineyard)	Ver	highly	1476 – 1750 DD	717 – 1335 DD
Density of prostrate hairs on tip	V108	partially	None to low	Very low to very high
Shoot attitude (before tying)	V110	highly	Semi-drooping to drooping	Erect to horizontal
Tendrils complexity	Tendrils	highly	Simple	Forked
Colour of ventral side of internodes	V112	partially	Green, red, violet	Green, green and red, red
Colour of dorsal side of internodes	V111	partially	Green, red, violet	Green, green and red, red
Colour of ventral side of nodes	V114	partially	Green, red, violet	Green, green and red, red
Colour of dorsal side of nodes	V113	partially	Green, red, violet	Green, green and red, red
Main colour of woody shoot	V160	partially	Red-violet, grey	Yellow, brownish, red-violet
Lenticels on woody shoot	V161	highly	Present	Absent
Density of prostrate hairs on main veins on lower side of young leaf blade	V126	partially	None to low	Very low to very high
Area of anthocyanin coloration of main veins on lower side of mature leaf blade	V133	partially	Absent to beyond the 2 nd ramification	Absent to up to the 1 st ramification
Size of mature leaf blade (greenhouse)	Size	highly	16 – 94 cm ²	101 – 294 cm ²
Number of lobes	V130	partially	1 – 3	3 – 11
Degree of opening / overlapping of petiole sinus	V141	partially	Very wide open to slightly open	Wide open to overlapped
Number of teeth	Teeth	highly	< 20 teeth	> 20 teeth
Insertion of first inflorescence	V165	partially	2 nd – 4 th node	3 rd – 6 th node
Concave top of the flower	Top	highly	Absent	Present
Colour of berry skin	Colour	partially	Blue black, bronze	Green yellow, rose, grey, dark red violet, blue black
Bloom on berry skin	Bloom	highly	Absent	Present
Ease of detachment of berry from pedicel	Detach	highly	Brush absent	Brush present
Thickness of skin	Thick	highly	Very thick	Very thin to thick
Adhesion of skin to flesh	Adh	highly	No adhesion	Adhesion
Lenticels on berry skin	Lent	highly	Present	Absent
Juice yield in mL/g	Yield	highly	0.4 mL/g	0.4 – 0.7 mL/g
Shape of seed	Shape	highly	Oblong	Ovoid
Transversal ridges on dorsal side of seeds	Ridge	highly	Present	Absent
Bud hairiness	Bhair	highly	Sparse flock	Dense flock
Colour of bud hairs	Bcol	highly	Orange	Light brown
Size of bud	Bsize	highly	Small	Big

Figure 1: Ranges and distribution observed in *V. vinifera*, *M. rotundifolia* and the populations, of the traits for which QTLs were detected. Column 1 shows the ranges observed between *V. vinifera* and *M. rotundifolia*. Column 2 – 4 show the distributions observed in the BC1 population in the vineyard (2) and in the greenhouse (3), and in the BC2 population (4). Distributions of all the traits specific to *M. rotundifolia* are given in Figure S2.

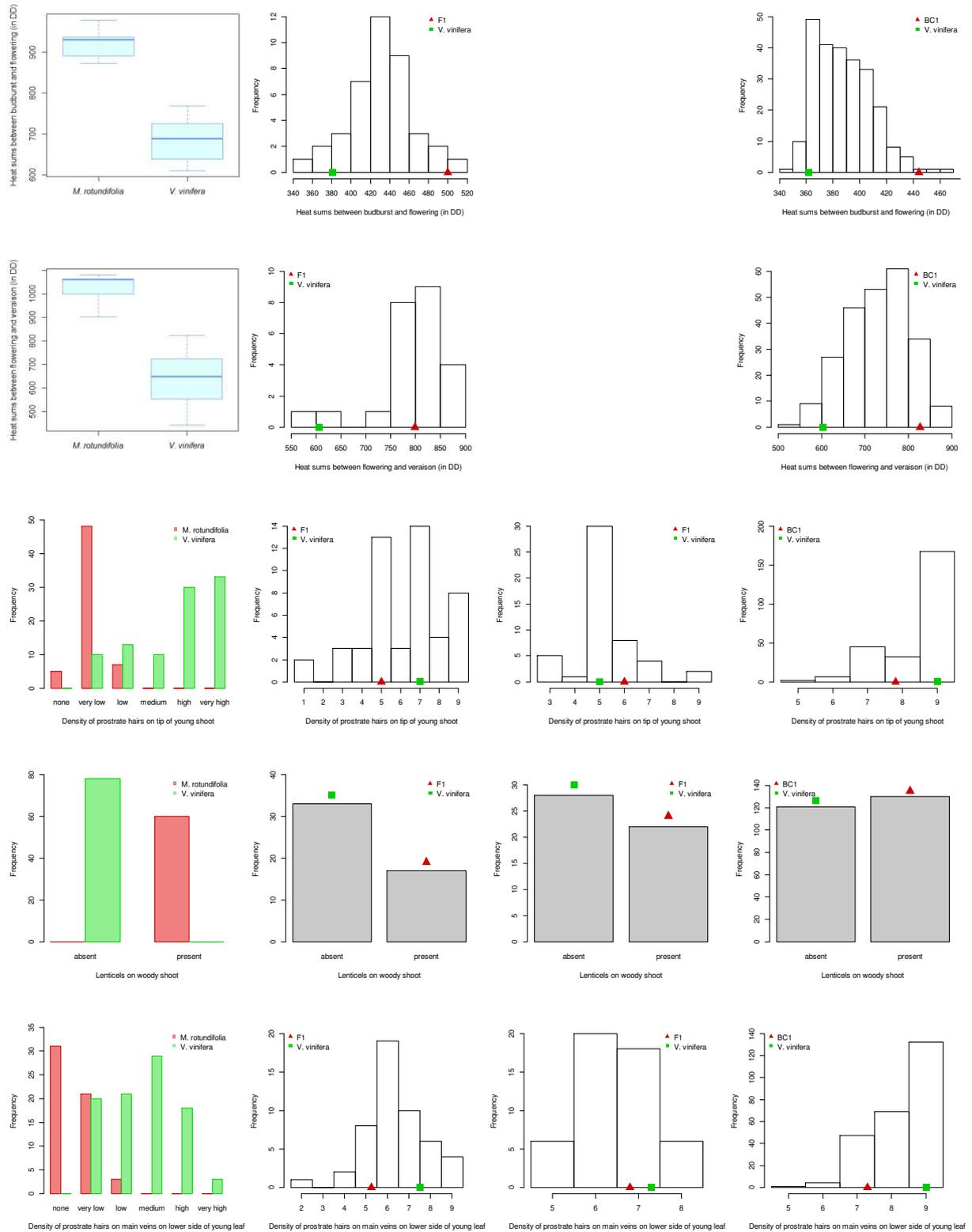


Figure 1 (continued)

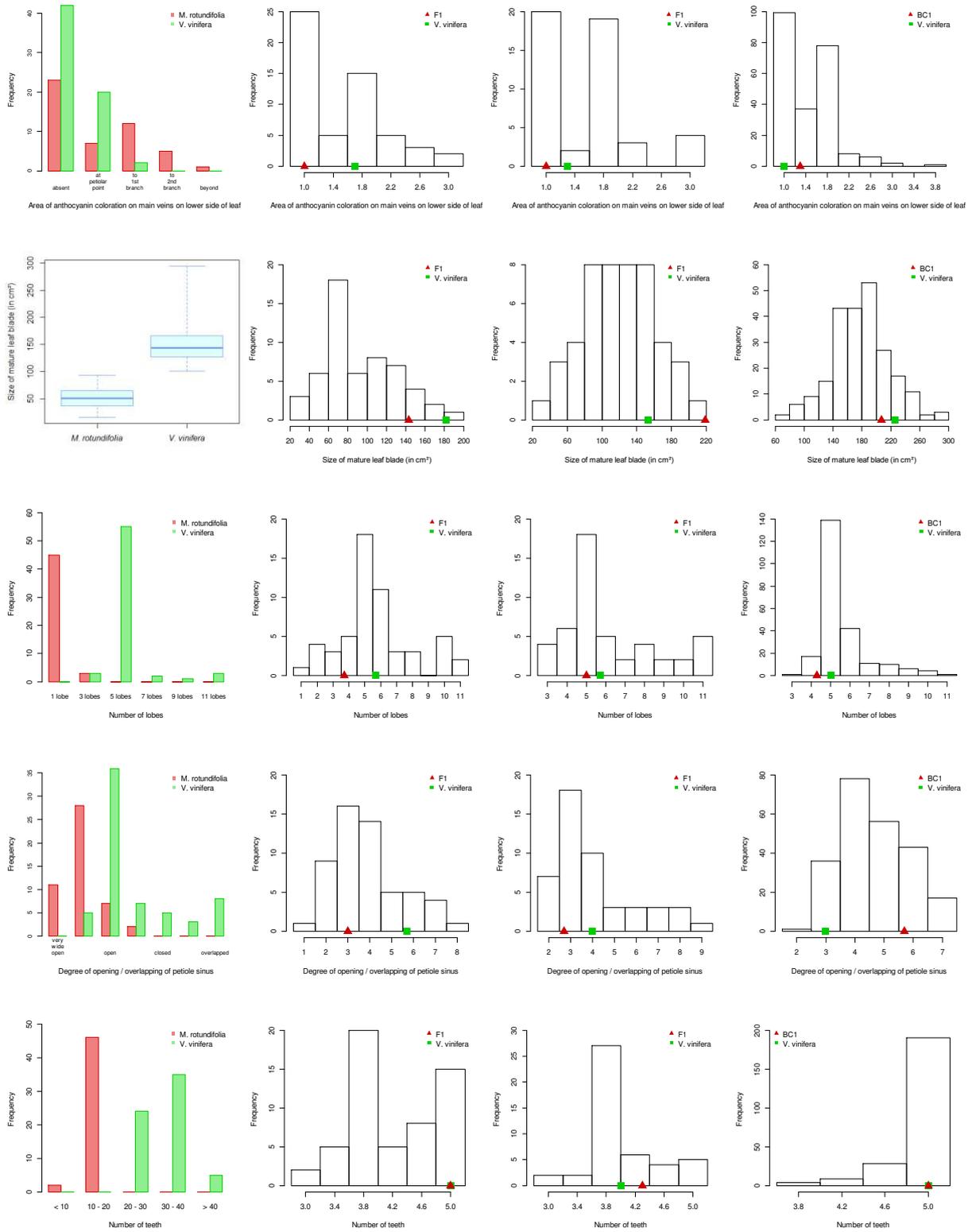
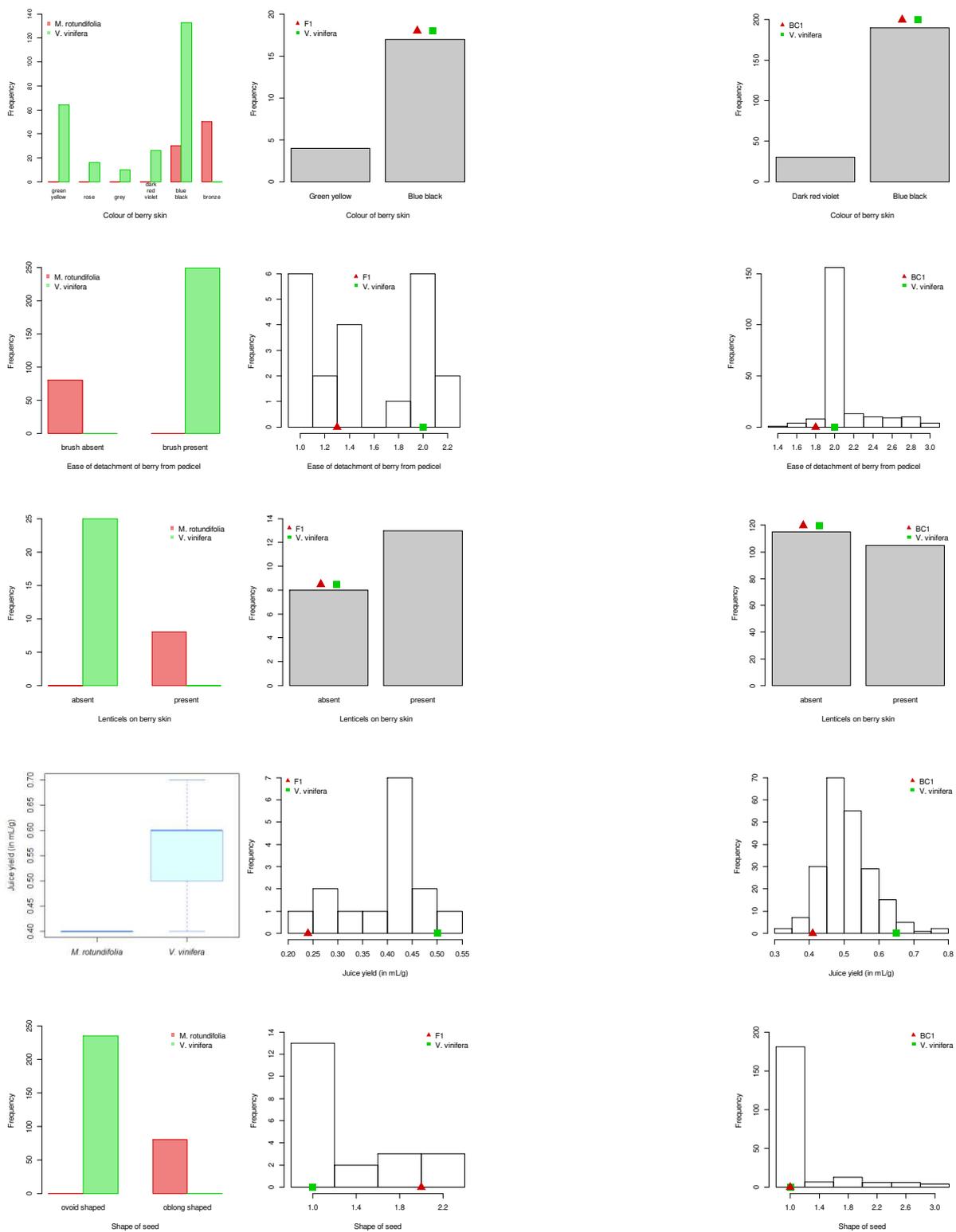


Figure 1 (continued)



More interestingly, new traits are characterized as specific. Some of these traits are related to colour of some organs: *M. rotundifolia* displays violet colour on the shoot, grey colour on the woody shoot, bronze berry skin and orange bud hair. Anthocyanin coloration of *M. rotundifolia* extends further on the main veins of the lower side of the leaf blade than for *V. vinifera*. In addition, several traits related to the berry are identified as specific. Among the most important traits, *M. rotundifolia*'s berry skin is very thick, without bloom and easy to separate from the flesh. *M. rotundifolia*'s berries are low in juice compared to their weight and, as a result, juice yield is low. Finally, the shape of the flowers are different between both species with a concave top of the flower in *V. vinifera*.

Variability of specific traits in the offspring populations

Traits identified as specific to *M. rotundifolia* were studied on three backcross populations (BC1, BC2 and BC4). Due to a lack of fertility, reproductive organs and phenological stages could not be evaluated in greenhouse on BC1 and BC4 populations (Figure 1 and Figure S2).

Transmission of some traits are different during the BC1 cross. For instance, F1 hybrid do not have bloom on the berry, but all the individuals of BC1 and BC2 have bloom. Surprisingly, even if F1 and BC1 parents do not show lenticels on the skin of their berry, half of their progeny have lenticels.

Ranges and distribution are similar between BC1 and BC2 for several traits including the phenological traits, the area of anthocyanin coloration on the leaf blade, the degree of opening/overlapping of petiole sinus and the seed shape.

The variability observed in the BC1 population is reduced in the BC2 population, for some other traits. For instance, the densities of hairs on the tip of the young shoot and on the main veins of the young leaf are distributed between 1 and 9 in the BC1 population and between 5 and 9 in the BC2 population. The number of teeth ranges from 30 to more than 40 teeth in the BC1 population whereas almost every individuals in the BC2 population have at least 40 teeth.

In some cases, distributions are completely different between BC1 and BC2 populations, with BC2 individuals mainly grouped in one class, although the BC2 population shows the same variability as the BC1 population. For example, 60% and 87% of the BC2 individuals have leaves with 5 lobes or brush on the pedicel, respectively.

Surprisingly, tendril complexity shows a different pattern than what was expected. A new phenotype was observed with both simple and forked tendrils on the same individuals for 30% of the BC1 population and 8% of the BC2 population.

QTL detection

A QTL analysis was performed for the traits specific to *M. rotundifolia* and segregating in the BC populations. Previously, parental genetic linkage maps were established (Delame *et al.*, in prep.) and allowed us to determine the origin of each chromosome region in the hybrids, i.e. homologous regions, where both alleles are inherited from *V. vinifera*, vs. homeologous regions, where one allele is inherited from *V. vinifera* and the other from *M. rotundifolia*.

A LOD significance threshold was calculated with a permutation test for each trait in each population. QTLs detected with a LOD score above the LOD threshold were included in the QTL model of the trait for the population studied (Table 3). Percentages of variance explained (phenotypic variance, PV, genotypic variance, GV) take into account the presence of the other QTLs in the model.

A total of 66 QTLs were detected throughout the three mapping populations. Among them, 42 QTLs were detected in the BC2 population which is the largest one. Fifty QTLs were detected on the hybrid maps: 34 QTLs are in a homeologous region, 16 QTLs are in a homologous region. Sixteen QTLs were detected on the *V. vinifera* maps.

Table 3: Characteristics of the factors detected for the traits specific to *M. rotundifolia*

Trait	Pop ^a	Chr ^b	Pos ^c	Nearest marker	1-LOD interval	LOD score	PV ^d	h ^{2e}	GV ^f	Origin ^g	Code name ^h
Flo	BC2	2	44.9	S2_4350115	42.0 – 69.5	3.27	4.6	84.4	5.4	Vv ♀	Flo_BC2@2
	BC2	8	15.5	S8_10752339	9.7 – 32.8	5.44	7.8	84.4	9.2	Mr (+)	Flo_BC2@8
	BC2	12	46.2	S12_8763247	42.0 – 49.0	4.37	6.2	84.4	7.3	Mr (-)	Flo_BC2@12
	BC2	13	43.7	S13_9797394	38.0 – 54.0	3.71	5.2	84.4	6.2	Vv ♀	Flo_BC2@13
	BC2	14	50.0	S14_23352955	39.1 – 61.0	8.84	13.1	84.4	15.5	Vv ♀	Flo_BC2@14
Ver	BC2	6	17.9	S6_6517466	16.0 – 18.8	11.85	19.1	90.1	21.2	Mr (+)	Ver_BC2@6
	BC2	8	15.0	S8_10660875	6.0 – 16.5	5.37	8.0	90.1	8.9	Mr (+)	Ver_BC2@8
	BC2	14	17.0	S14_6659604	7.0 – 23.3	3.69	5.4	90.1	6.0	Vv ♀	Ver_BC2@14
	BC2	17	35.0	S17_6265083	32.0 – 39.0	6.92	10.5	90.1	11.7	Vv ♀	Ver_BC2@17
V108	BC1-out	9	46.4	S9_13696619	34.0 – 52.4	3.74	30.0	90.8	33.0	Mr (-)	V108_BC1o@9
	BC1	9	46.4	S9_13696619	40.0 – 52.4	3.40	19.8	57.6	34.4	Mr (-)	V108_BC1@9
	BC1-out	10	0.0	VMC3d7	0.0 – 5.0	3.38	26.3	90.8	29.0	Vv ♂	V108_BC1o@10
	BC2	10	4.4	S10_2185208	2.0 – 7.0	10.37	19.8	69.6	28.5	Vv ♂	V108_BC2@10
	BC1	16	53.3	S12_5421433	51.8 – 56.0	4.03	24.2	57.6	42.0	Mr (+)	V108_BC1@16
	BC2	16	20.0	S16_6708073	2.0 – 36.0	4.19	7.5	69.6	10.7	Vv ♀	V108_BC2@16
V161	BC1-in	8	28.6	S8_10752318	26.0 – 38.0	4.65	39.2	-	-	Mr (+)	V161_BC1i@8
	BC1	8	28.6	S8_10752318	25.6 – 49.0	3.54	27.3	-	-	Mr (+)	V161_BC1@8
	BC2	9	40.1	S9_13794167	37.0 – 43.0	4.77	9.6	-	-	Mr (-)	V161_BC2@9
V126	BC2	1	47.7	S1_9788411	43.0 – 57.0	3.80	8.4	50.6	16.6	Vv ♂	V126_BC2@1
	BC4	4	68.9	S4_24610676	52.0 – 68.9	3.00	11.0	29.8	37.0	Vv ♀	V126_BC4@4
	BC2	6	17.9	S6_6517466	10.0 – 20.6	4.33	8.5	50.6	16.8	Mr (-)	V126_BC2@6
	BC4	7	34.0	VMC5h5	25.0 – 66.0	3.77	1.0	74.8	1.3	Vv ♂	V126_BC4@7
	BC4	8	39.9	S8_13784702	36.0 – 41.5	5.66	22.6	29.8	76.0	Mr (+)	V126_BC4@8
	BC2	10	2.0	S10_722441	0.0 – 10.0	6.17	7.5	50.6	14.8	Vv ♂	V126_BC2@10
	BC2	13	32.6	S13_6982597	17.0 – 39.0	3.08	7.7	50.6	15.2	Vv ♀	V126_BC2@13
	BC4	15	39.5	S15_19299622	30.0 – 39.5	3.25	12.1	29.8	40.4	Vv ♀	V126_BC4@15
V133	BC2	9	10.0	S9_1518044	0.0 – 20.9	3.60	5.6	56.3	9.9	Mr (-)	V133_BC2@9
	BC2	11	21.0	S11_2481909	13.0 – 27.0	3.73	8.7	56.3	15.4	Vv ♂	V133_BC2@11
	BC2	12	44.3	S12_7509701	41.3 – 50.0	3.86	8.1	56.3	14.4	Mr (+)	V133_BC2@12
	BC4	14	10.4	S14_19261160	8.0 – 13.0	5.90	31.9	74.8	42.7	Vv ♀	V133_BC4@14
	BC1-in	14	53.0	S14_19528147	52.0 – 56.0	7.11	27.0	87.6	30.8	Mr (-)	V133_BC1i@14
	BC1	14	55.6	S14_20424670	54.0 – 56.0	5.80	15.4	62.8	24.6	Mr (-)	V133_BC1@14
	BC1-in	14	57.0	S14_20424635	56.0 – 58.7	11.20	55.6	87.6	63.5	Mr (-)	V133_BC1i@14b
	BC1-out	14	58.0	S14_22522751	56.0 – 60.0	7.68	54.4	73.0	74.5	Mr (-)	V133_BC1o@14
	BC1	14	58.0	S14_22522751	56.0 – 58.7	11.82	42.0	62.8	66.9	Mr (-)	V133_BC1@14b
Size	BC2	19	46.0	S19_17865453	34.0 – 51.0	3.83	12.9	56.3	22.8	Vv ♀	V133_BC2@19
	BC2	2	33.0	S2_3542505	15.0 – 49.0	4.09	7.2	56.8	12.7	Vv ♀	Size_BC2@2
	BC2	4	32.0	S4_6033723	25.0 – 48.0	3.24	6.7	56.8	11.7	Vv ♀	Size_BC2@4
	BC2	10	10.5	S10_3578397	0.0 – 15.0	3.34	6.2	56.8	10.9	Vv ♂	Size_BC2@10
	BC1	11	0.0	S11_278984	0.0 – 24.0	3.11	23.3	47.6	49.0	Mr (-)	Size_BC1@11
	BC2	12	40.3	S10_10271666	33.2 – 52.0	3.64	5.4	56.8	9.6	Mr (+)	Size_BC2@12
V130	BC1-in	18	71.0	S18_23674961	69.0 – 76.0	5.11	43.7	77.7	56.2	Mr (+)	Size_BC1i@18
	BC2	1	15.0	S1_4912743	6.0 – 18.0	2.93	5.0	51.5	9.7	Vv ♀	V130_BC2@1
	BC2	8	55.9	S8_22458970	48.1 – 55.9	4.30	7.5	51.5	14.6	Mr (+)	V130_BC2@8
	BC2	9	39.6	S9_12929763	37.0 – 43.0	5.49	9.7	51.5	18.8	Mr (+)	V130_BC2@9
	BC2	9	45.0	S9_21899687	44.6 – 48.0	3.37	5.8	51.5	11.3	Mr (+)	V130_BC2@9b
	BC1-in	16	75.8	S16_22778942	54.0 – 77.3	3.56	32.9	77.4	42.5	Mr (+)	V130_BC1i@16
V141	BC1	16	75.8	S16_22778942	52.0 – 77.3	3.52	25.9	62.8	41.3	Mr (+)	V130_BC1@16
	BC2	4	65.0	S4_21780964	64.0 – 71.0	8.67	17.5	60.0	29.2	Vv ♂	V141_BC2@4
	BC2	8	54.5	S8_21727864	47.1 – 55.6	3.16	8.4	60.0	14.1	Mr (+)	V141_BC2@8
	BC2	10	24.0	S10_5584822	20.4 – 41.4	4.83	8.3	60.0	13.9	Vv ♂	V141_BC2@10
	BC2	11	48.0	S11_12184314	41.0 – 53.0	4.05	8.4	60.0	14.0	Vv ♂	V141_BC2@11
	BC2	14	49.5	S14_25355123	43.3 – 54.4	3.49	7.6	60.0	12.7	Vv ♂	V141_BC2@14
	BC1-in	14	52.4	S14_24101742	47.0 – 63.8	4.24	43.7	85.8	51.0	Vv ♂	V141_BC1i@14Vv
BC1	14	61.9	VVlp26	48.0 – 63.8	2.73	19.6	70.4	27.9	Vv ♂	V141_BC1@14Vv	

Trait	Pop ^a	Chr ^b	Pos ^c	Nearest marker	1-LOD interval	LOD score	PV ^d	h ^{2e}	GV ^f	Origin ^g	Code name ^h
	BC1-out	14	76.8	S14_27436231	73.0 – 85.7	5.61	43.7	81.4	53.7	Mr (+)	V141_BC1o@14
	BC1-in	14	85.7	S14_29796500	82.0 – 85.7	4.25	43.6	85.8	50.8	Mr (+)	V141_BC1i@14Mr
	BC1	14	85.7	S14_29796500	83.0 – 85.7	6.25	40.4	70.4	57.4	Mr (+)	V141_BC1@14Mr
Teeth	BC1	2	54.4	S2_15748161	22.6 – 57.4	2.71	20.6	45.1	45.7	Mr (+)	Teeth_BC1@2
Sexual organs	BC1-out	2	15.9	VV1b23	14.0 – 22.0	13.45	83.0	-	-	Vv ♂	Sex_BC1o@2
Colour	BC2	2	66.0	S2_8397002	54.6 – 69.5	5.52	16.1	-	-	Mr	Color_BC2@2Mr
	BC2	2	58.1	S2_17017153	55.0 – 63.0	6.77	17.1	-	-	Vv ♂	Color_BC2@2Vv
Detach	BC1-out	8	81.0	S8_21179413	79.0 – 86.2	6.43	78.9	65.3	120.9	Mr (+)	Detach_BC1o@8
Lent	BC2	1	76.3	S1_24013463	70.0 – 76.3	3.42	4.8	-	-	Vv ♂	Lent_BC2@1
	BC2	16	60.1	S16_23229811	58.0 – 61.5	10.72	23.9	-	-	Mr (+)	Lent_BC2@16
Adh	BC1-out	5	0.0	S5_255863	0.0 – 3.7	6.48 ⁱ	-	-	-	Mr (+)	Adh_BC1o@5
	BC2	12	43.3	S12_7293218	14.7 – 55.4	2.89 ^j	-	-	-	Mr (+)	Adh_BC2@12
Yield	BC1-out	2	0.0	S2_235906	0.0 – 6.0	3.67	72.8	-	-	Mr (+)	Yield_BC1o@2
Shape	BC2	2	69.5	S2_6536072	45.0 – 69.5	3.78	7.1	56.4	12.6	Mr (+)	Shape_BC2@2
	BC2	7	60.0	S7_21639900	59.2 – 60.7	6.68	13.0	56.4	23.1	Vv ♀	Shape_BC2@7
	BC2	7	60.7	S7_22026965	60.2 – 61.0	5.70	11.0	56.4	19.5	Vv ♀	Shape_BC2@7b
	BC2	17	1.9	S17_569324	0.0 – 12.0	2.94	5.5	56.4	9.7	Mr (+)	Shape_BC2@17

^a Plant population; ^b Chromosome; ^c Peak position (cM); ^d Percentage of phenotypic variance explained; ^e Trait heritability; ^f Percentage of genotypic variance explained; ^g Origin of the QTL (Vv ♂ = QTL detected on the *V. vinifera* map, Vv ♀ = QTL detected on the hybrid map in an homologous region, Mr (+) = QTL detected on the hybrid map in an homeologous region, *M. rotundifolia*'s allele having the expected effect, Mr (-) = QTL detected on the hybrid map in an homeologous region, *M. rotundifolia*'s allele having the reverse effect); ^h Code name = Trait_Pop@Chr; ⁱ Analysis performed with the 2-part model, LOD for the conditioned part; ^j Analysis performed with the 2-part model, LOD for the binary part

- Phenology

Heat sums between budburst and flowering (Flo) and between flowering and veraison (Ver) have a high heritability in the BC2 population, 84.4% and 90.1% respectively. Both traits have the same genetic architecture: they are controlled by one major QTL, Flo_BC2@14 and Ver_BC2@6 (LOD score of 8.8 and 11.9, PV of 13% and 19%, respectively) and additional QTLs explaining 4.6-10.5% of PV. For Flo, Flo_BC2@8 and Flo_BC2@12 were detected in homeologous regions. *M. rotundifolia*'s allele of Flo_BC2@8 induces an increase in Flo, i.e. lateness, whereas *M. rotundifolia*'s allele of Flo_BC2@12 induces a decrease, i.e. earliness. For Ver, Ver_BC2@6 and Ver_BC2@8 were detected in homeologous regions, on chromosome 6 and on chromosome 8, at 0.54 cM from Flo. *M. rotundifolia*'s alleles of these two QTLs induces an increase in Ver. Altogether, these two QTLs explain 30.1% of GV.

- Hairiness

Heritability of the density of prostrate hairs on the tip of the young shoot (V108) and on the main veins on the lower side of the young leaf (V126) varies significantly between populations or environments. Five QTLs were found for V108. V108_BC1@9/V108_BC1o@9 was detected in a homeologous region, *M. rotundifolia*'s allele increasing the density of hairs on the young shoot. V108_BC1@16 and V108_BC2@16 were both detected on chromosome 16: one in the BC1 population in a homeologous region, the other one in the BC2 population in a homologous region, the physical distance between both peaks being estimated at around 10 Mb. Finally, V108_BC1o@10 and V108_BC2@10 were both detected on the *V. vinifera* maps in two different populations, at 2 Mb from each other. Eight QTLs were found for V126. Among them, V126_BC2@10 was detected on the *V. vinifera* map, in the same region than V108_BC1o@10 and V108_BC2@10. V126_BC2@6 and V126_BC4@8 were detected in a homeologous region, explaining 16.8% and 76% of GV, respectively.

- Lenticels

Lenticels on the woody shoot (V161) and on the berry skin (Lent) are controlled by different factors. For V161, two factors were found, one on chromosome 8 (V161_BC1i@8/V161_BC1@8) and one on chromosome 9 (V161_BC2@9). Both factors are in homeologous regions but they display opposite effects: *M. rotundifolia*'s allele of V161_BC1i@8/V161_BC1@8 determines presence of lenticels on the wood whereas *M. rotundifolia*'s allele of V161_BC2@9 their absence. For Lent, Lent_BC2@1 and Lent_BC2@16 were both detected in the BC2 population. Lent_BC2@16 is in a homeologous region and induces lenticels on the berry skin. Surprisingly, Lent_BC2@1 was detected on the *V. vinifera* map.

- Leaf traits

The area of anthocyanin coloration of main veins on the lower side of the leaf (V133) has a medium heritability 56.3-87.6% depending on the population and the environment. A total of nine QTLs were found to control this trait throughout the three populations. Among them, five QTLs are in a homeologous region on chromosomes 9, 12 and 14. Chromosome 14 appears to have a strong impact because of the huge number of QTLs detected and their GV between 24.6% and 74.5%. However, these QTLs were detected in homologous regions or the effect of the *M. rotundifolia*'s allele is contrary to what is expected.

The degree of opening/overlapping of petiole sinus (V141) is also strongly controlled by chromosome 14. Among the nine QTLs found to control this trait, five QTLs were detected on chromosome 14, explaining 12.7-57.4% of GV. On each map, they are distributed in two distinct regions on the chromosome: a region between 24.1 Mb and 27.6 Mb detected on the *V. vinifera* maps, containing V141_BC2@14, V141_BC1i@14Vv and V141_BC1@14Vv, and a region between 27.0 Mb and 29.8 Mb detected in a homeologous region, containing V141_BC1i@14Mr/V141_BC1@14Mr and V141_BC1o@14. These last QTLs explain around 50% of GV and determine a wider opening of the petiole sinus.

The size of the leaf (Size) has a medium heritability, 47.6-77.7%. This trait is controlled by six QTLs, including three QTLs in a homeologous region. Size_BC1i@18 was detected in greenhouse at the end of the chromosome 18. It explains 56.2% of GV and *M. rotundifolia*'s allele reduces the size of the leaf.

The number of lobes (V130) has a medium heritability, 51.5-77.4%. Five QTLs were found to control this trait. Four QTLs are in a homeologous region and explain 11.3-42.5% of GV whereas QTL of *V. vinifera* explains only 9.7%. *M. rotundifolia*'s alleles reduce V130.

- Berry traits

Interestingly, chromosome 2 has an important role in the control of berry traits. Sex_BC1o@2 controlling the sex of the flower was detected on the *V. vinifera* map. This locus has already been detected by Marguerit *et al.* (2009). Color_BC2@2Mr and Color_BC2@2Vv controlling the berry colour (Colour) were detected in the same region: one QTL was detected on the *V. vinifera* map and the other in a homeologous region. Juice yield (Yield) is also controlled by a QTL located on chromosome 2 in a homeologous region. Finally, the shape of the seed (Shape) is controlled by four QTLs on chromosomes 2, 7 and 17. Shape_BC2@2 and Shape_BC2@17 were both detected in a homeologous region with a lower impact than Shape_BC2@7 and Shape_BC2@7b in a homologous region (GV of 12.6, 9.7, 23.1 and 19.5 respectively).

Discussion

M. rotundifolia is a species greatly interesting for grape breeding because of its multiple resistances to major diseases. However, this grapevine related species harbour features that make it totally unsuitable to traditional European viticulture and high quality wine production. In order to better control these unwanted traits in the breeding process, we compared *M. rotundifolia* and *V.*

vinifera to identify the phenotypic features specific to *M. rotundifolia* and analysed their genetic determinism. This study gives us useful tools to manage QTLs controlling interesting traits, such as resistance genes, and unwanted traits, by knowing their position, their effect or their stability.

Impact of the recombination rates on the QTL detection

The increase of marker density improve the resolution of the map and thus enhance the precision of the QTL detection and its location. The use of high-density genetic maps allowed researchers to identify new QTLs with a high precision in a lot of species (Li *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2017; Tao *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2012). That is why we used high density genetic linkage maps based on a thousand of SNPs (Delame *et al.*, in prep.). Here, we studied the genetic determinism of 16 traits on various organs showing specificities in *M. rotundifolia*'s accessions. We detected 66 QTLs, including 31 QTLs with a confidence interval lower than 10 cM (Table 3). This precision is highly interesting in plant breeding for several reasons. First, the high density of markers on the map increase the possibility to have a genetic marker near the QTL detected. Genetic markers are powerful tools in marker assisted selection (MAS) when they are located close enough the QTL of interest to prevent recombination. Second, a good precision in the location of the QTL reduce the regions in which to look for candidate genes.

However, we studied backcross populations produced from an initial interspecific cross between *V. vinifera* and *M. rotundifolia*. In BC2 and further backcrosses, some chromosome pairs are composed of homeologous regions, i.e. regions where one allele is inherited from *V. vinifera* and the other from *M. rotundifolia*, and homologous regions, i.e. regions where both alleles are inherited from *V. vinifera*. A previous study showed that in interspecific crosses between *V. vinifera* and *M. rotundifolia*, for such chromosome pairs, the recombinations occur preferentially in homologous regions rather than in homeologous regions (Delame *et al.*, in prep.). As a consequence, entire parts of chromosomes of several megabases are contracted in few centimorgans on the genetic maps. The consequence of these recombination rate variations is a bias on the QTL detection and in the precision of their localization. Indeed, Noor *et al.* (2001) showed that regions with low recombination rate may express stronger apparent QTLs than regions with high recombination rate. This is the result of a potential concentration of several small QTLs in 1-2 cM on the genetic map, corresponding to large region on the physical map. Moreover, when a QTL is detected in a region of no-recombination, the peak of the QTL cover the entire region on the physical map. Thus it is not possible to locate precisely QTLs detected in such regions.

Transgression and new modalities

Usually, variation observed in a population is expected to be comprised within the range of variation of the two parents, particularly with qualitative traits. In our study, lenticels on the woody shoot (V161) are absent for the *V. vinifera* parent, present for the F1 and BC1 parents and either present or absent in the BC1 and BC2 populations. However, for all the other traits studied here, some individuals in the populations harbour features that are absent in the parents. This phenomenon of transgression can be explained by the presence of QTLs of opposite effects in each of both parents. In our study, 9 QTLs detected in homeologous regions have effects opposite to what we expected, i.e. alleles from *M. rotundifolia* induced a phenotype closer to *V. vinifera* than to *M. rotundifolia*. In fact, it is not surprising to identify QTLs with opposite effects in the same individual. This phenomenon was also observed in rice in the cultivar 'LAC23', reported to be the rice cultivar with the lowest cadmium concentration in grains. 'LAC23' carries genes increasing and genes decreasing cadmium concentration (Sato *et al.*, 2011). Such QTLs are interesting to manage the expression of unwanted *M. rotundifolia*'s traits, by combining QTLs of opposite effects.

Another kind of transgression is the appearance of new phenotypes in the offspring. This phenomenon occurs with qualitative traits. In our study, we confirmed the fact that *M. rotundifolia* tendrils are simple whereas *V. vinifera* tendrils are forked (Bouquet, 1980; Patel & Olmo, 1955). The analysis of the segregation of this trait in BC populations reveals that tendril branching is a complex trait. The two parental phenotypes, simple tendrils and forked tendrils, were observed, but, surprisingly, a third type of individuals bearing both type of tendrils appeared in the progenies. This last group of individuals is quite surprising. However, this result could be explained by the strong link between tendrils and inflorescences, and the complexity of their development. Indeed, tendrils and inflorescences come from the same structures in the bud meristem (Vasconcelos *et al.*, 2009). These structures differentiate into either tendril or inflorescence, depending on internal factors such as hormones (gibberellin and cytokinin) or carbohydrate content, and external factors such as light or temperature (Antcliff & Webster, 1955; Bennett *et al.*, 2005; Buttrose, 1970; Sanchez & Dokoozlian, 2005; Srinivasan & Mullins, 1981; Vasconcelos *et al.*, 2009). The huge amount of environmental factors interfering in the development of tendrils could explain the strong variation in the expression of this trait on the same individual.

Stable vs specific QTLs

Main part of the QTL detected in our study were detected in only one population or environmental condition. Of the 66 QTLs detected, 15 were detected in several populations or environments. V108_BC1o@10 and V108_BC2@10, controlling the density of prostrate hairs on tip, were both detected at the beginning of the chromosome 10 in two different populations. Both QTLs are inherited from *V. vinifera* and their confidence intervals overlap. They probably are the same QTL present in two different varieties of *V. vinifera*. On the contrary, V108_BC1@16 and V108_BC2@16 were both detected on chromosome 16 in two different populations but at two different positions. The first one was detected at the end of the chromosome in a homeologous region and the other one at the beginning in a homologous region.

Chromosome 14 appears to be strongly involved in the genetic determinism of several traits. Four QTLs controlling V133 (area of anthocyanin coloration of the mature leaf) and five QTLs controlling V141 (degree of opening of petiole sinus) were detected on this chromosome. V133_BC4@14, V141_BC2@14, V141_BC1i@14Vv and V141_BC1@14Vv were all inherited from *V. vinifera* whereas V133_BC1i@14, V133_BC1@14, V133_BC1i@14b, V133_BC1o@14, V133_BC1@14b, V141_BC1o@14, V141_BC1i@14Mr and V141_BC1@14Mr were detected in a homeologous region. These QTLs show a strong effect by explaining at least 24.6% of the genotypic variance. However, the locations of the QTLs detected in this region are not stable across the environments and the populations. Thus it is not possible to establish the number of QTLs involved and their precise localization.

In our study, bronze berry skin colour was identified as specific to *M. rotundifolia*. Unfortunately, this trait was absent from the populations studied and all the fertile individuals produced green yellow, dark red violet or blue black berries. However, a locus controlling Colour was detected on chromosome 2 in both parental maps of the BC2 population (Color_BC2@2Mr and Color_BC2@2Vv). Previous studies led on *V. vinifera* identified a locus involved in berry color on chromosome 2 (Doligez *et al.*, 2002; Fournier-Level *et al.*, 2009). This locus is localized in the confidence intervals of our QTLs.

QTLs of strong positive effect in M. rotundifolia

QTLs detected in homeologous regions have various effects on the phenotype. Several QTLs have a strong effect on the phenotype: V133_BC1i@14b, V133_BC1o@14, V133_BC1@14b, Size_BC1i@18, V141_BC1o@14, V141_BC1i@14Mr, V141_BC1@14Mr, Detach_BC1o@8 and

Yield_BC1o@2 explain more than 40% of the phenotypic variance of the population in which they were detected. On the contrary, several QTLs have weak effect on the phenotype: Flo_BC2@8, Flo_BC2@12, Ver_BC2@8, V161_BC2@9, V126_BC2@6, V133_BC2@9, V133_BC2@12, Size_BC2@12, V130_BC2@8, V130_BC2@9, V130_BC2@9b, V141_BC2@8, Shape_BC2@2 and Shape_BC2@17 explain less than 10% of the phenotypic variance. However, as explained above *M. rotundifolia*'s alleles have in some cases effect opposite to what is expected. During selection, it is important to consider the two aspects, strength and direction of the QTL effect, to concentrate efforts on the most unfavorable QTLs. QTLs from *M. rotundifolia* with strong positive effect have to be eliminated preferentially. Another way to manage these QTLs is to combine them with other QTLs with negative effects.

Chromosomes/loci involved in several traits

Regions involved in the control of several traits specific to *M. rotundifolia* are highly interesting. First, the elimination of such regions allow the elimination of several QTLs in the same time. Second, the presence in the same region of QTLs controlling unwanted traits and QTLs controlling traits of interest is important to manage in order to eliminate the first ones while conserving the second ones. Here, Ver_BC2@6 and V126_BC2@6 were detected at exactly the same locus on chromosome 6. On the genetic map, the regions covered by the confidence interval of each QTL are narrow. However, given that markers used for the map are SNPs, their physical position are known and we are able to extrapolate between genetic and physical positions (Delame *et al.*, in prep.). The region of chromosome 6 with the two QTLs is a homeologous region and the recombination rate is low. This results in a large part of the chromosome covered by the confidence intervals on the physical map. Thus, even if QTLs are detected at the same locus on the genetic map, they may be at two distinct physical positions. This phenomenon also impact Color_BC2@2Mr, Color_BC2@2Vv and Shape_BC2@2 which are not localized exactly at the same locus on the genetic map but cover the same region on the physical map. Moreover, some QTLs are not located at the same locus but their confidence interval overlap: V130_BC2@8, V141_BC2@8 and Detach_BC1o@8 on chromosome 8, V161_BC2@9, V130_BC2@9, V130_BC2@9b, V108_BC1o@9 and V108_BC1@9 on chromosome 9, V108_BC1@16, V130_BC1i@16, V130_BC1@16 and Lent_BC2@16 on chromosome 16. During the selection process, the elimination of regions carrying several QTLs inducing *M. rotundifolia* features will help to come back to a *V. vinifera* phenotype.

QTLs near resistance genes

Several loci of resistance to downy and powdery mildew have been identified in *M. rotundifolia*. *Rpv1* and *Run1* were located on chromosome 12 near the SSR marker VMC4f3.1, *Rpv2* and *Run2* were located on chromosome 18 near SSR markers VVin16 and VMC7f2, respectively, and *Ren5* was located on chromosome 14 near VMC9c1 (Barker *et al.*, 2005; Blanc *et al.*, 2012; Merdinoglu *et al.*, 2003; Pauquet *et al.*, 2001; Riaz *et al.*, 2011; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006). In our study, four QTLs were detected on chromosome 12, one on chromosome 18, and eleven on chromosome 14. Six QTLs detected on chromosome 14 were inherited from *V. vinifera*. The five other QTLs are all located on the lower part of the chromosome whereas the resistance locus is on the upper part. The separation of these QTLs from the resistance locus during backcross will be quite easy. Given the distance between both regions, there is a high chance to have a recombination. Flo_BC2@12, V133_BC2@12, Size_BC2@12 and Adh_BC2@12, detected on chromosome 12, have their LOD peak located upstream the region of *Rpv1/Run1* but the confidence intervals of each QTL are very wide and overlap this region. These wide confidence intervals are the result of the low recombination rate on chromosome 12 in the BC2 population. In fact, factors controlling these four traits are probably not located in the same region than *Rpv1/Run1* and separation of the two regions by a recombination is

possible. On the contrary, Size_BC1i@18 is located in the region of *Rpv2/Run2*. The elimination of this QTL during backcrosses will be difficult because of its proximity with resistance genes. The probability to have one recombination between the two loci is very low. However, Size_BC1i@18 would have a low impact on variety acceptability. Indeed, the difference between *M. rotundifolia* and *V. vinifera* for the size of their leaf blade is low and have to be measured with precision to be observed. In addition, although the effect of this QTL is strong (43.7% PV), it could be partially balanced by another QTL with opposite effect such as Size_BC1@11.

Lateness conferred by M. rotundifolia

Phenology is an important feature for grape production and for adaptation to climate change. In our study, we showed that heat sum needs to reach flowering and veraison are bigger for *M. rotundifolia* than for *V. vinifera*. This lateness in flowering and veraison could be interesting in the context of adapting grapevine varieties to climate change (Duchêne *et al.*, 2012). In our study, we identified five QTLs controlling Flo on chromosomes 2, 8, 12, 13 and 14 and four QTLs controlling Ver on chromosomes 6, 8, 14 and 17. In *V. vinifera*, QTLs for Flo have already been identified on chromosomes 2 and 14 at the same positions as the QTLs we detected (Costantini *et al.*, 2008; Duchêne *et al.*, 2012). QTLs for Ver have already been identified on chromosomes 6 and 14 near the QTLs we detected (Costantini *et al.*, 2008; Duchêne *et al.*, 2012). In our study, we identified in *V. vinifera* one new QTL for Flo on chromosome 13 and one new QTL for Ver on chromosome 17. We also identified in *M. rotundifolia* two new QTLs for Flo on chromosomes 8 and 12, and two new QTLs for Ver on chromosomes 6 and 8. Ver_BC2@6 in *M. rotundifolia* is not located in the same region than the QTL detected in *V. vinifera* by Costantini *et al.* (2008). Flo_BC2@8, Ver_BC2@6 and Ver_BC2@8 could be interesting in grapevine breeding to produce new grapevine varieties which mature later than traditional varieties. This lateness is highly interesting to balance the increasingly earlier harvesting date due to climate change.

Conclusion

In our study, we identified 31 traits specific to *M. rotundifolia* by comparing several accessions of the species to *V. vinifera*. By studying genetic determinism of these traits we identify 66 QTLs involved in their control. During selection programs, the properties of all these QTLs are important to consider to improve the elimination of *M. rotundifolia* specific traits. Regions bearing several QTLs or QTLs with strong effects are important to eliminate. QTLs close to regions containing resistance genes have to be treated as a matter of priority. Here, we showed that only few genetic factors were located near resistance genes. Given the genetic distance between resistance genes and QTLs controlling *M. rotundifolia*'s specific traits, eliminating these traits is possible. However, in the case of the impossibility to eliminate such QTLs, the conservation of other QTLs with opposite effects may help to return to a *V. vinifera* phenotype. Knowing genetic determinism of traits specific to *M. rotundifolia* will greatly improve breeding programs using this species by selecting the best individuals for each cross.

Supporting information

Table S1: Methods and score scales used to evaluate traits

Figure S1: Traits specific to *M. rotundifolia*.

Figure S2: Ranges and distribution observed in *V. vinifera*, *M. rotundifolia* and in the BC populations.

Author Contributions: D. M. conceived the original research plans and raised the funding. V. D. supervised plant material. M. D. and M. G. performed the experiments. E. D. supervised the data

analysis; M. D. performed the data analysis. M. D. and D. M. wrote the article with contributions of all the authors.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the Fondation Jean Poupelain for funding our work through the HealthyGrape2 program. We thank, V. Dumas and J. Misbach for excellent assistance in plant maintenance.

References

- Anonymous, 2009. 2^{ème} édition de la liste des descripteurs OIV pour les variétés et espèces de *Vitis*. Paris, 233p.
- Antcliff A. J., Webster W. J., 1955. Studies on the sultana vine. I. Fruit bud distribution and bud burst with reference to forecasting potential crop. *Australian Journal of Agricultural Research*, 6 (4), 565-588.
- Bacilieri R., Lacombe T., Le Cunff L., Di Vecchi-Staraz M., Laucou V., Genna B., Péros J. P., This P., Boursiquot J. M., 2013. Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. *BMC Plant Biology*, 13, 25.
- Barba P., Cadle-Davidson L., Harriman J., Glaubitz J. C., Brooks S., Hyma K., Reisch B., 2014. Grapevine powdery mildew resistance and susceptibility loci identified on a high-resolution SNP map. *Theoretical and Applied Genetics*, 127 (1), 73-84.
- Bennett J., Jarvis P., Creasy G. L., Trought M. C., 2005. Influence of defoliation on overwintering carbohydrate reserves, return bloom, and yield of mature Chardonnay grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56 (4), 386-393.
- Barker C. L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M. B., Bouquet A., Adam-Blondon A. F., Thomas M. R., Dry I., 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (2), 370-377.
- Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Dumas V., Mestre P., Merdinoglu D., 2012. A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 125 (8), 1663-1675.
- Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E.H., Mestre P., Merdinoglu D., 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 123 (1), 43-53.
- Bouquet A., 1980. *Vitis* x *Muscadinia* hybridization: A new way in grape breeding for disease resistance in France. *Proceedings of the third International Symposium on Grape Breeding*. Davis, University of California, 42-61.
- Bouquet A., 1981. Resistance to grape fanleaf virus in muscadine grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Disease*, 65 (10), 791-793.
- Broman K. W., Wu H., Sen S., Churchill G. A., 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19 (7), 889-890.
- Butrosse M. S., 1970. Fruitfulness in grapevines: the response of different cultivars to light, temperature and day length. *Vitis*, 9 (2), 121-125.

- Costantini L., Battilana J., Lamaj F., Fanizza G., Grando M. S., 2008. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): from quantitative trait loci to underlying genes. *BMC Plant Biology*, 8, 38.
- Delame M., Prado E., Blanc S., Robert G., Mestre P., Rustenholz C., Merdinoglu D. Introgression reshapes recombination distribution in grapevine interspecific hybrids.
- Doligez A., Bouquet A., Danglot Y., Lahogue F., Riaz S., Meredith C., Edwards K. J., This P., 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical and Applied Genetics*, 105 (5), 780-795.
- Duchêne E., Huard F., Dumas V., Schneider C., Merdinoglu D., 2010. The challenge of adapting grapevine varieties to climate change. *Climate Research*, 41 (3), 193-204.
- Duchêne E., Butterlin G., Dumas V., Merdinoglu D., 2012. Towards the adaptation of grapevine varieties to climate change: QTLs and candidate genes for developmental stages. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (4), 623-635.
- Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS One*, 6 (5), e19379.
- Fournier-Level A., Le Cunff L., Gomez C., Doligez A., Ageorges A., Roux C., Bertrand Y., Souquet J. M., Cheynier V., This P., 2009. Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) berry: a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genetics*, 183 (3), 1127-1139.
- Gallais, 1989. *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*. Masson, Paris, 588p.
- Goffinet M. C., Welser M. J., Himelrick D. G., 2001. *Anatomy and morphology*. In: Basiouny F. M., Himelrick D. G. (eds). *Muscadine grapes*. ASHS Press, Alexandria, USA, 15-50.
- Li B., Tian L., Zhang J., Huang L., Han F., Yan S., Wang L., Zheng H., Sun J., 2014. Construction of a high-density genetic map based on large-scale markers developed by specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq) and its application to QTL analysis for isoflavone content in *Glycine max*. *BMC Genomics*, 15, 1086.
- Marguerit E., Boury C., Manicki A., Donnart M., Butterlin G., Némorin A., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Ollat N., Decroocq S., 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 118 (7), 1261-1278.
- Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Coste P., Dumas V., Haetty S., Butterlin G., Greif C., 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Horticulturae*, 603, 451-456.
- Nicolas S. D., Péros J. P., Lacombe T., Launay A., Le Paslier M. C., Bérard A., Mangin B., Valière S., Martins F., Le Cunff L., Laucou V., Bacilieri R., Dereeper A., Chatelet P., This P., Doligez A., 2016. Genetic diversity, linkage disequilibrium and power of a large grapevine (*Vitis vinifera* L) diversity panel newly designed for association studies. *BMC Plant Biology*, 16, 74.
- Olmo H. P., 1986. The potential role of (*vinifera x rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 42 (8), 921-926.
- Noor M. A., Cunningham A. L., Larkin J. C., 2001. Consequences of recombination rate variation on quantitative trait locus mapping studies: simulations based on the *Drosophila melanogaster* genome. *Genetics*, 159 (2), 581-588.

- Pap D., Riaz S., Dry I. B., Jermakow A., Tenschler A. C., Cantu D., Oláh R., Walker M. A., 2016. Identification of two novel powdery mildew resistance loci, *Ren6* and *Ren7*, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biology*, 16, 170.
- Patel G. I., Olmo H. P., 1955. Cytogenetics of *Vitis*: I. The hybrid *V. vinifera* × *V. rotundifolia*. *American Journal of Botany*, 42 (2), 141-159.
- Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A.-F., 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 (8), 1201-1210.
- Qi H., Wang N., Qiao W., Xu Q., Zhou H., Shi J., Yan G., Huang Q., 2017. Construction of a high-density genetic map using genotyping by sequencing (GBS) for quantitative trait loci (QTL) analysis of three plant morphological traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica*, 213 (4), 83.
- Riaz S., Tenschler A.C., Ramming D.W., Walker M.A., 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 122 (6), 1059-1073.
- Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R., 2012. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (1), 163-176.
- Ruel J. J., Walker M. A., 2006. Resistance to Pierce's disease in *Muscadinia rotundifolia* and other native grape species. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (2), 158-165.
- Sánchez L. A., Dokoozlian N. K., 2005. Bud microclimate and fruitfulness in *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56 (4), 319-329.
- Sato H., Shirasawa S., Maeda H., Nakagomi K., Kaji R., Ohta H., Yamaguchi M., Nishio T., 2011. Analysis of QTL for lowering cadmium concentration in rice grains from 'LAC23'. *Breeding Science*, 61 (2), 196-200.
- Srinivasan C., Mullins M. G., 1981. Physiology of flowering in the grapevine – a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32 (1), 47-63.
- Tao A., Huang L., Wu G., Afshar R. K., Qi J., Xu J., Fang P., Lin L., Zhang L., Lin P., 2017. High-density genetic map construction and QTLs identification for plant height in white jute (*Corchorus capsularis* L.) using specific locus amplified fragment (SLAF) sequencing. *BMC Genomics*, 18, 355.
- Vasconcelos M. C., Greven M., Winefield C. S., Trought M. C., Raw V., 2009. The flowering process of *Vitis vinifera*: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60 (4), 411-434.
- Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Coste P., Dumas V., Butterlin G., Bouquet A., Merdinoglu D., 2006. Genetic analysis of resistance to downy mildew from *Muscadinia rotundifolia*. 9th International Conference on Grape genetics and Breeding, Udine, Italie.
- Zou G., Zhai G., Feng Q., Yan S., Wang A., Zhao Q., Shao J., Zhang Z., Zou J., Han B., Tao Y., 2012. Identification of QTLs for eight agronomically important traits using an ultra-high-density map based on SNPs generated from high-throughput sequencing in sorghum under contrasting photoperiods. *Journal of Experimental Botany*, 63 (15), 5451-5462.

3. Analyses additionnelles

Pour pouvoir comparer la phénologie de *V. vinifera* et de *M. rotundifolia*, des analyses préalables ont dû être réalisées. Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence une meilleure tolérance aux températures élevées de *M. rotundifolia* par rapport à *V. vinifera*.

L'étude des stades phénologiques de la vigne est réalisée à l'aide de la mesure des sommes de températures entre deux stades de développement. Dans l'article « Comparative analysis of *Vitis vinifera* and *Muscadinia rotundifolia* for traits related to phenology and morphology and genetic control of *M. rotundifolia*'s specific traits », le zéro de végétation de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* a été déterminé grâce à un suivi du nombre de feuilles apparaissant en fonction de la température. Ce suivi a été réalisé sur quatre rameaux identifiés sur quatre accessions de *M. rotundifolia* et sur quatre rameaux identifiés sur quatre pieds du clone PN40024. Des mesures ont ainsi été effectuées entre le 4 avril et le 18 juillet en serre. Cependant, seules les mesures faites entre le 4 avril et le 20 juin ont été utilisées pour la détermination du zéro de végétation de chaque espèce. En effet, entre le 20 juin et le 18 juillet, les températures moyennes ont régulièrement dépassé 24°C et le comportement des deux espèces vis-à-vis des températures élevées est différent (Figure IV.1). Dans notre étude, lorsque la température moyenne dépasse 22°C, le nombre de feuilles formées en une semaine diminue chez *V. vinifera* alors qu'au contraire, *M. rotundifolia* continue à produire plus de feuilles. Ainsi, *V. vinifera* produit en moyenne 3,5 feuilles à une température hebdomadaire moyenne de 21,4°C et 2,6 feuilles à 26,0°C alors que *M. rotundifolia* produit 2,5 et 3,6 feuilles en moyennes pour les mêmes températures. De plus, cet arrêt de croissance constaté chez *V. vinifera* a un effet durable puisque malgré une baisse de la température après une période chaude (22,9°C en moyenne entre le 27 juin et le 4 juillet et 21,8°C entre le 11 et le 18 juillet), l'apparition des feuilles reste ralentie par rapport à la vitesse de croissance observée avant le 20 juin (Figure IV.2 et Tableau IV.1).

De nombreuses études s'intéressent à l'adaptation de la vigne et de la viticulture au changement climatique (Duchêne *et al.*, 2010 ; Duchêne *et al.*, 2012 ; García de Cortázar-Atauri *et al.*, 2010). En effet, selon le 5^{ème} rapport du GIEC, la température mondiale pourrait augmenter de plus de 2°C d'ici 2050 par rapport à la période 1986 – 2005 (Kirtman *et al.*, 2013). Cependant, comme nous avons pu le constater, *V. vinifera* est assez sensible aux températures élevées. Des études précédentes ont établi un optimum de température pour *V. vinifera* situé entre 24,3°C et 27°C selon les variétés pour la période floraison-véraison (García de Cortázar-Atauri *et al.*, 2010). Au-delà de ces

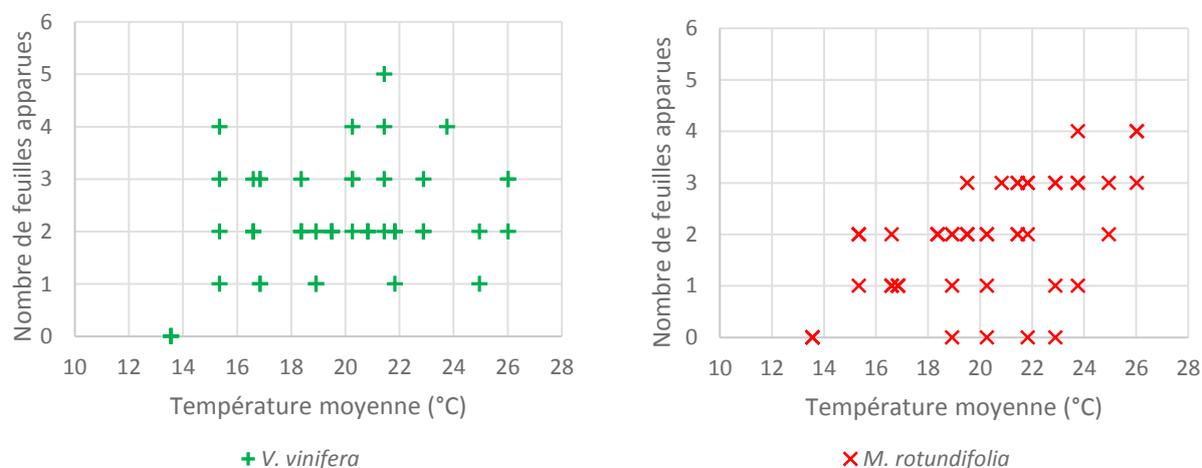


Figure IV.1. Nombre de feuilles formées sur un rameau en une semaine en fonction de la température moyenne chez *V. vinifera* et *M. rotundifolia*

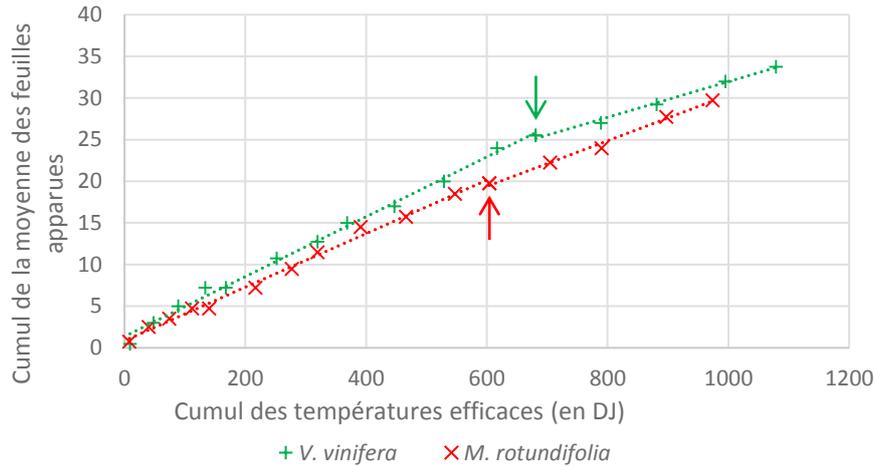


Figure IV.2. Évolution de la moyenne de feuilles apparues en une semaine en fonction de la température efficace chez *V. vinifera* et *M. rotundifolia*

Les flèches représentent la date du 20 juin pour *V. vinifera* (en vert) et *M. rotundifolia* (en rouge). Les droites de régressions ont été représentées (en pointillés) pour les périodes avant et après le 20 juin pour les deux espèces.

Tableau IV.1. Températures moyennes relevées sur les périodes de mesures

Périodes entre deux mesures	Température moyenne sur la période (°C)
04/04 - 10/04	15,3
11/04 - 17/04	16,8
18/04 - 24/04	16,6
25/04 - 01/05	13,6
02/05 - 08/05	21,4
09/05 - 16/05	19,5
17/05 - 22/05	18,4
23/05 - 29/05	20,8
30/05 - 05/06	20,3
06/06 - 12/06	23,8
13/06 - 19/06	18,9
20/06 - 26/06	25,0
27/06 - 03/07	22,9
04/07 - 10/07	26,0
11/07 - 17/07	21,8

températures, la croissance de la plante ralentit fortement. À l'inverse, *M. rotundifolia* montre une meilleure adaptation à ces températures. Cette tolérance aux températures élevées est un caractère intéressant à introgresser chez *V. vinifera* dans le cadre de la création de nouvelles variétés adaptées au climat futur.

4. Conclusion

La comparaison de plusieurs accessions de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* a conduit à l'identification de 31 caractères phénologiques et morphologiques présentant des spécificités chez *M. rotundifolia*. Bien que ces caractères n'aient *a priori* pas d'impact sur la qualité organoleptiques des vins produits, leur élimination lors du processus d'introgression peut favoriser l'acceptation des

nouvelles variétés de vigne issues de croisement interspécifiques entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia*. Ainsi, des caractères tels que la présence de lenticelles sur le sarment et sur les baies ou la présence de vrilles simples sont des marqueurs de la présence de *M. rotundifolia* dans l'ascendance des nouvelles variétés de vigne et peuvent être source de rejet de la variété par la profession. Néanmoins, certains caractères spécifiques portés par *M. rotundifolia* peuvent présenter un intérêt pour la sélection, notamment dans le cadre de l'adaptation de la viticulture au changement climatique. Ainsi, la tardivité de *M. rotundifolia* et sa tolérance plus élevée que *V. vinifera* aux températures élevées sont des caractères à prendre en considération dans les programmes de sélection futurs.

La connaissance du déterminisme génétique des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* est nécessaire pour favoriser leur élimination ou leur conservation lors des backcross. Lors de l'étude présentée dans l'article « Comparative analysis of *Vitis vinifera* and *Muscadinia rotundifolia* for traits related to phenology and morphology, and genetic control of *M. rotundifolia*'s specific traits », le déterminisme génétique de 16 caractères a été établi. Certaines régions ont été identifiées comme importantes pour l'élimination des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* : les régions impliquées dans le contrôle de plusieurs caractères (chromosome 14), les régions porteuses de QTL à effet fort ou de facteurs qualitatifs (chromosomes 2 et 14 en particulier) et les régions porteuses de facteurs de résistance (chromosome 18). À l'inverse, quelques régions ont été identifiées comme porteuses de caractères potentiellement intéressants tels que la tardivité (chromosomes 6 et 8). Enfin, certaines régions n'ont semblé impliquées dans le contrôle d'aucun caractère spécifique de *M. rotundifolia* (chromosomes 3 et 5). Les résultats de cette étude sont une source de connaissance et d'outils utiles pour l'introgession de facteurs de résistance issus de *M. rotundifolia* chez *V. vinifera*.

Chapitre V :
Étude comparative
des métabolites secondaires
de *Vitis vinifera*
et *Muscadinia rotundifolia*

V. Étude comparative des métabolites secondaires de *Vitis vinifera* et *Muscadinia rotundifolia*

1. Introduction

La baie de *M. rotundifolia* possède un goût dit « foxé », spécifique des vignes américaines. De nombreuses études ont porté sur la détection et l'identification des composés volatiles de la baie pour déterminer lesquels étaient à l'origine de cet arôme (Baek *et al.*, 1997 ; Baek & Cadwallader, 1999 ; Lamikanra *et al.*, 1996 ; Lin, 2014). Plusieurs composés ont ainsi été identifiés chez *M. rotundifolia* et, en particulier, l'*o*-aminoacétophénone a été associée au goût foxé. D'autres études ont également cherché à identifier les métabolites secondaires non volatiles présents dans la baie, et plus particulièrement les composés phénoliques tels que les anthocyanes, les stilbènes, les flavonoïdes ou les ellagitannins (Flamini *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2005 ; Pastrana-Bonilla *et al.*, 2003 ; Talcott & Lee, 2002). Cependant, bien que beaucoup d'études se soient intéressées au contenu métabolique de *V. vinifera* d'une part et de *M. rotundifolia* d'autre part, peu d'entre elles ont comparé de façon approfondie les deux espèces. En revanche, une comparaison entre *V. vinifera* et un hybride (*V. vinifera* x *V. labrusca*) a montré que leur contenu anthocyanique différait (Mazzuca *et al.*, 2005). Contrairement à *V. vinifera*, qui produit des anthocyanes 3-glucosides, l'hybride produit des anthocyanes 3,5-diglucosides. Cette différence a été confirmée et étendue à l'ensemble des vignes américaines par Zhu *et al.* (2012). Ces résultats ont été utilisés pour traquer les variétés issues de croisements interspécifiques. Ainsi, la présence de composés spécifiques de *M. rotundifolia* dans les baies des nouvelles variétés résistantes aux maladies risque de fortement entraver leur diffusion. Il est donc nécessaire de déterminer quels sont les composés spécifiques de *M. rotundifolia* et de connaître leur déterminisme génétique afin de faciliter leur élimination lors de l'introgession à l'aide de marqueurs génétiques.

Cette étude a été menée dans l'objectif d'identifier les métabolites spécifiques de *M. rotundifolia* et leur déterminisme génétique et a fait l'objet d'un manuscrit intitulé « Metabolomics analysis of leaves and berries from *Vitis vinifera* and *Muscadinia rotundifolia* », présenté ci-après. Dans cette étude, différentes accessions de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* ont été comparées afin de déterminer quels étaient les métabolites spécifiques de *M. rotundifolia* dans les feuilles et dans les baies. Le déterminisme génétique de la présence de ces composés a ensuite été établi grâce à l'analyse des populations de backcross. Les mesures ont été réalisées en chromatographie gazeuse (GC) sur les baies pour déterminer la présence des composés volatiles libres ou glycosylés, et en chromatographie liquide (LC) sur les feuilles et sur les baies pour déterminer la présence des composés non volatiles. Ces deux techniques, couplées à un spectromètre de masse permettent la détection d'ions et l'identification des métabolites dont ils sont issus. Les analyses en LC sur les baies n'ont pas été intégrées à l'article et sont présentées dans le paragraphe V. 3. Analyses additionnelles.

2. Metabolomics analysis of leaves and berries from *Vitis vinifera* and *Muscadinia rotundifolia*

DELAME M.^{1,2}, BALTENWECK R.¹, CLAUDEL P.¹, MERDINOGLU D.¹

¹Université de Strasbourg, INRA, SVQV UMR-A 1131, F-68000 Colmar, France, ²AgroParisTech, Direction des Formations Doctorales, 19 avenue du Maine, 75015 Paris, France.

Abstract

Muscadinia rotundifolia, an American species related to the European grapevine *Vitis vinifera*, is interesting for its high level of resistance to grapevine diseases. However, *M. rotundifolia* displays a foxy flavour which is not adapted to French wine production. Moreover, French-American hybrid grapes have a poor image and cannot be cultivated to produce labelled wines. Hence, some known specific metabolites are used to track the presence of American grapes in the ascendance of new varieties. Backcross-based introgression has been used in French breeding programs to transfer resistance factors from *M. rotundifolia* into cultivated genetic backgrounds while eliminating the *M. rotundifolia*'s traits, such as off-flavours. In this study, several accessions of *V. vinifera* and *M. rotundifolia* were compared by liquid and gas chromatographies (LC and GC) to detect metabolites specific to *M. rotundifolia*. GC-MS analysis allowed to detect 23 free and 19 glycosidically bound metabolites specific to *M. rotundifolia* in berries. All but one metabolites were identified, including furaneol and *o*-aminoacetophenone. LC-MS analysis allowed to detect 26 ions specific to *M. rotundifolia* in leaves. Three mapping populations were generated by pseudo-backcrosses using *M. rotundifolia* as the donor parent and several *V. vinifera* cultivars as the recurrent parents. Genetic determinism of leaf metabolites specific to *M. rotundifolia* was established using high density genetic linkage maps mainly based on SNPs. Presence or absence in leaf of the analysed ions was determined by a limited number of chromosomal regions. More, combined use of LC-MS and genetic analyse allowed to speed up the identification of metabolites, including myricetin rhamnoside and 3,4,3'-tri-*O*-methylelagic acid glucoside.

Introduction

Since the 19th century, the introduction of several pests and diseases from North America has completely modified the European viticulture. The main agents threatening grapevine are the aphid *Daktulosphaira vitifoliae*, the Ascomycete *Erysiphe necator*, causing powdery mildew, and the Oomycete *Plasmopara viticola*, causing downy mildew. Most of the varieties of European cultivated grapevine, *Vitis vinifera*, are susceptible to these pests and diseases. However, resistance factors allowing to partially control them were found in Asian and American *Vitis* species related to grapevine such as *V. riparia* (Marguerit *et al.*, 2009), *V. amurensis* (Blasi *et al.*, 2011; Schwander *et al.*, 2012) or *V. piasezki* (Pap *et al.*, 2016). *Muscadinia rotundifolia*, a North American grapevine also related to *V. vinifera*, is highly resistant to major grapevine pathogens and factors providing resistance to powdery and downy mildew have already been identified (Merdinoglu *et al.*, 2003; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006; Blanc *et al.*, 2012; Pauquet *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2005; Riaz *et al.*, 2011). *M. rotundifolia* is also resistant to other pathogens causing severe damages such as *Guignardia bidwellii*, responsible for black-rot disease, *Xylella fastidiosa*, responsible for Pierce's disease, and nematodes of the genus *Xiphinema*, vectors for viruses (Bouquet, 1981; Olmo, 1986; Ruel & Walker, 2006).

M. rotundifolia is a cultivated species, used in the United States to produce jams, juices and wine. However, it is not adapted to European wine production because of its foxy flavour and other

unwanted cultural traits. The use at the beginning of the 20th century of French-American hybrid grapes and their prohibition later left deep scars. As a consequence, varieties originated from an interspecific cross with American grapes have a poor image and cannot be cultivated for labelled wines. Backcross-based introgression has been used to transfer resistance factors into cultivated backgrounds while eliminating the *M. rotundifolia*'s traits, and, in particular, the unwanted cultural traits and off-flavours. For a long time, anthocyanin content of the berries were used to detect the presence of American grapes in European varieties and hybrids. Indeed, anthocyanins differ between American and *V. vinifera* grapes by a second glycosylation, producing anthocyanin 3,5-diglucosides in addition to anthocyanin 3-glucosides (Mazzuca *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2012). Volatiles, anthocyanins, flavonols and stilbenes have been widely studied in *V. vinifera* and *M. rotundifolia* berries for their impact on berry colour, taste and health benefit (Baek *et al.*, 1997; Baek & Cadwallader, 1999; Flamini *et al.*, 2013; Flamini *et al.*, 2015; Narduzzi *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2012). In previous studies, wide comparisons between species of the genus *Vitis* were conducted and differences in metabolic profiles in grapes and canes were detected (Narduzzi *et al.*, 2015; Pawlus *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2012). However, all these studies used only one or two accessions of each species. Today, there is a lack of study comparing in details *V. vinifera* and *M. rotundifolia* in order to establish which metabolites are specific to each species. This issue is important to address because the presence of metabolites specific to *M. rotundifolia* in new resistant varieties could hamper their use in European viticulture, even if such metabolites are not involved in cultural ability or flavour.

Gas and liquid chromatographies (GC, LC) are powerful tools to detect volatile and non-volatile metabolites in the berries. Both technics are coupled with mass spectrometry (MS) to obtain the mass of the compound and thus identify it. Given the huge amount of studies analysing volatile metabolites and the existence of databases listing all the compounds already detected, it is relatively easy to identify volatile metabolites detected by GC-MS. On the contrary, the number of ions detected by LC-MS is much higher than in GC-MS because of a larger amount of non-volatile than volatile metabolites in berries. This makes the identification of non-volatile metabolites harder.

The metabolic pathway of main family compounds have been elucidated in *M. rotundifolia* and *V. vinifera* (Flamini *et al.*, 2013; Kambiranda *et al.*, 2016; Oliva *et al.*, 2017; Pawlus *et al.*, 2012). The genetic control of some metabolites has also been elucidated, such as the methylation of resveratrol, the synthesis of monoterpenes or the glycosylation of anthocyanins to produce anthocyanin 3-glucosides and anthocyanin 3,5-diglucosides (Duchêne *et al.*, 2009; Jánváry *et al.*, 2009; Kambiranda *et al.*, 2016; Schmidlin *et al.*, 2008). However, the genetic determinism of metabolites from *M. rotundifolia* have been poorly studied. This approach, by establishing a link between various ions controlled by the same genome region, could be particularly interesting tool to help identifying the metabolites detected by LC-MS. Moreover, establishing the genetic determinism of metabolites specific to *M. rotundifolia* may also help to manage their transmission during breeding programs.

Several genetic linkage maps of pseudo-backcross populations have already been established to discover resistance genes in *M. rotundifolia* (Merdinoglu *et al.*, 2003; Riaz *et al.*, 2011; Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006). However, these maps were established by low throughput technics. Today, next-generation sequencing allows the development of high density genetic linkage maps, which are a tool to improve the precision of the QTL detection. Genotyping-by-sequencing (GBS) is a simple robust procedure allowing the discovery of thousands of SNPs for hundreds of individuals, rapidly and at low cost (Elshire *et al.*, 2011). Recently, high density genetic linkage maps of interspecific crosses and backcrosses of *V. vinifera* with *M. rotundifolia* have been established using GBS (Delame *et al.*, in prep.).

The purpose of this study is, first, to compare the metabolite profiles of *M. rotundifolia* and *V. vinifera* in order to detect metabolites specific to *M. rotundifolia*. To this end, an untargeted metabolomics approach (LC-MS and GC-MS) was performed on leaves and berries of *V. vinifera* and

M. rotundifolia. Then, *M. rotundifolia* specific ions detected by GC-MS were identified. In a second step, the ions detected by LC-MS were studied in mapping populations to identify and locate the loci that control their production.

Material and methods

Plant material

The comparison of *V. vinifera* and *M. rotundifolia* was performed in 2015 using two groups of plants compound with accessions of each species (Table 1). In this study, we wanted to focus on compounds specific to *M. rotundifolia* whatever the environment. For that reason, plants were grown in two different conditions. Given the low rate of fertility of the two species in the greenhouse, accessions were not the same between leaf and berry analyses.

Concerning the berry analysis, the *M. rotundifolia* group consisted of five accessions grown in the greenhouse until the June 9th 2015, after flowering, and put outside after. Two accessions entirely grown in the greenhouse with the same crop management were added to the study. The *V. vinifera* group consisted of 9 accessions grown in the greenhouse and 14 accessions grown in the vineyard and 1 grown in both environments. The accessions in the greenhouse were part of a core collection of 279 accessions (Nicolas *et al.*, 2016) and the vineyard accessions were part of an ampelographic collection of 204 accessions established since 2001 at INRA Colmar, France. Characteristics of the vineyard and of the technical itinerary are given in (Delame *et al.*, in prep.). The choice of accessions was explained in (Delame *et al.*, in prep.).

Concerning the leaf analysis, the *M. rotundifolia* group consisted of 24 accessions, 19 grown in greenhouse and the 5 accessions used for berry analysis. The *V. vinifera* group consisted of 29 accessions, 14 grown in the greenhouse, 12 grown in the vineyard and 3 grown in both environments.

The study of the genetic determinism of metabolites specific to *M. rotundifolia* was performed on the leaves using the three pseudo-backcross (BC) populations described in (Delame *et al.*, in prep.): a BC1 and a BC4 populations derived from *M. rotundifolia* cv. Trayshed and a BC2 population derived from *M. rotundifolia* cv. NC184-4. The BC1 population was compound of 45 individuals in the vineyard and 40 individuals in the greenhouse; the BC4 population was compound of 72 individuals in the greenhouse; the BC2 population was compound of 193 individuals in the vineyard.

Extraction of berry samples

To determine *M. rotundifolia* specific metabolites in berries, around 40 g of berries were sampled for each individual on several bunches, in order to increase the homogeneity of the samples. Extraction protocol was adapted from Duchêne *et al.* (2009). Seeds were removed from berries which were then ground under liquid nitrogen, suspended in 40 mL of water after addition of 40 mg of sodium sulphite. Each sample was supplemented with 20 µL of a 3-octanol solution (1 g/L) as internal standard. Samples were then centrifugated (27 min, 12,500 rpm, 4 °C) and the supernatant was passed through a glass fibre pre-filter and a glass filter. A 1-g phase C18 silica-bonded non-polar column (Bond Elut Jr., Varian, Les Ulis, France) was first rinsed with 5 mL of methanol and 15 mL of ultra-pure water. Then, the sample was passed through the column at a rate of approximately one drop/s. After rinsing with 15 mL of ultra-pure water, total fraction of free volatiles was eluted with 4 mL of dichloromethane (Free). Then, the sample was eluted with 4 mL of absolute ethanol.

Twenty microlitres of a 4-nonanol solution (1 g/L) was added to the ethanol elution as an internal standard. This sample was then diluted in 40 mL of citrate/phosphate buffer (pH 4.5) and incubated with 50 mg of AR2000 glycolytic enzyme (Gist-Brocades, Seclin, France) overnight at 37.5 °C

Table 1: List of the accessions studied for leaf and berry analyses in the greenhouse (In) and in the vineyard or outside (Out).

Accession	Leaves		Berries	
	In	Out	In	Out
<i>V. vinifera</i>				
Verdelho tinto femelle	x			
Médouar	x			
Alba imputotato	x			
Rosa menna di Vacca	x			
Dureza	x			
Pozsony feher	x			
Vidiano	x			
Danugue	x			
Frankenthal rouge foncé	x			
Dimrit	x			
Riminèse	x			
Kövidinka	x		x	
Terret Bouschet	x		x	
Chaouch blanc	x		x	
Sultanine	x	x		x
Muscat d'Alexandrie	x	x		x
Carignan	x	x	x	x
Barbera		x		x
Cabernet-Sauvignon		x		x
Nebbiolo		x		x
Grenache		x		x
Karadjidji		x		x
Kremovoï		x		x
Pinot gris		x		x
Sourhak		x		x
Syrah		x		x
Tempranillo		x		x
Trollinger		x		x
Rannii		x		x
Beregi rozsas			x	
Tibouren			x	
Alexandroouli			x	
Urmi dinka			x	
Tavkveri			x	
Kaisermuskat			x	
<i>M. rotundifolia</i>				
Dulcet		x		x
Carlos		x	x	x
YugaxCarlos		x		x
Regale		x	x	x
Unnamed		x		x
Unnamed_1	x			
Unnamed_2	x			
Unnamed_3	x			
Unnamed_4	x			
Unnamed_5	x			
Unnamed_6	x			
Unnamed_7	x			
Unnamed_8	x			
Unnamed_9	x			
Unnamed_10	x			
Unnamed_11	x			
Unnamed_12	x			
Unnamed_13	x			
Unnamed_14	x			
Unnamed_15	x			
Unnamed_16	x			
Unnamed_17	x			
Unnamed_18	x			
Unnamed_19	x			

to release the glycosidically bound volatiles. After rinsing with 15 mL of ultra-pure water, the sample was passed through the column and rinsed again with 15 mL of ultra-pure water. Released bound volatiles were then eluted with 4 mL of dichloromethane (Bound). Free and Bound extracts were then dried and concentrated as described by Duchêne *et al.* (2009).

Extraction of leaf samples

To determine *M. rotundifolia* specific metabolites in leaves, two leaves were sampled for each individual. For each leaf, a 20 mm-diameter disc was stored at -80°C. Extraction was performed with 70 µl MeOH:water (1:1) per 1 mg of dry weight. An internal standard was added to the MeOH solution (diosmetin, 2 µg/mL). Samples were heated 30 min at 65 °C. Extracts were stored at -80 °C until LC-MS analysis.

The same extraction protocol was performed on the progeny. But one disc of 14 mm diameter was sampled on three different leaves of each individual. The three discs were pooled together and extraction was performed using 60 µl MeOH:water (1:1) per 1 mg of dry weight.

GC-MS analysis of volatile metabolites from berries

Extracts were analysed using an Agilent 6890 gas chromatograph equipped with a Gerstel MP2 autosampler and an Agilent 5973N mass spectrometer for peak detection and compound identification. The GC was fitted with a DB-Wax column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.5 µm film thickness, J&W Scientific). Helium was used as carrier gas with a column flow rate of 1.5 mL/min. The GC oven temperature was programmed from 45 °C to 235 °C at 2.7 °C/min (hold 10 min). The injector was set to 230 °C and used in pulsed splitless mode (15 psi for 0.50 min). The MS transfer line and ion source temperatures were set at 270 °C and 230 °C, respectively. The MS was operated in EI mode and positive ions at 70 eV were recorded with a scan range from m/z 30 to m/z 400. Agilent MSD ChemStation software (G1701DA, Rev D.03.00) was used for instrument control and data acquisition.

For GC-MS data processing, raw data files were converted into netCDF format using Agilent ChemStation software and subsequently, the XCMS software package included in the R platform was used to convert the GC-MS data set into a consensus table of time-aligned features intensities (namely, peak areas). The matchedFilter method was used to detect peaks, using a full width at half maximum (fwhm) of 3 s, a signal-to-noise threshold of 2, and a mass difference between distinct features of 0.25 m/z units. An alignment step was thus performed using the 'peakgroup' method. The processed data were then exported as a .csv file for further data analysis. A first rough filter was performed to keep metabolites that were considered as specific, i.e. the minimum area value of *M. rotundifolia* was above the maximal value of *V. vinifera*. Identification of detected volatiles was based on mass spectra matching with the standard NIST-14 libraries, comparison of the retention index, and comparison to the authentic standard when available. A semi-targeted analysis was then performed to analyse the specific metabolites using Agilent ChemStation software. The data are given as normalized peak area.

LC-MS analysis of non-volatile metabolites in leaves

The analysis of the methanol extracts was performed using an ultra-high performance liquid chromatography system (UHPLC; Dionex Ultimate 3000; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a diode array detector (DAD). The chromatographic separation was performed on a Nucleodur HTec column (150 mm x 2 mm, 1.8 µm particle size; Macherey-Nagel, Düren, Germany) maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile/formic acid (0.1%, v/v) (eluent A) and water/formic acid (0.1%, v/v) (eluent B) at a flow rate of 0.25 ml/min. The gradient elution program was as follows: 0–4 min, 80–70% B; 4–5 min, 70–50% B; 5–6.5 min, 50% B; 6.5–8.5 min, 50–0% B; 8.5–10 min, 0% B. The sample volume injected was 1 µL. The liquid chromatography system was coupled to an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with an electrospray

ionization source operating in positive and negative mode. Parameters were set at 350 °C for ion transfer capillary temperature and 3400 V for needle voltages in the positive mode and -2500 V in the negative mode. Nebulization with nitrogen sheath gas and auxiliary gas were maintained at 40 and 5 arbitrary units, respectively. The spectra were acquired within the m/z mass range of 110–1200 atomic mass units (a.m.u.), using a resolution of 50 000 at m/z 200 a.m.u. The system was calibrated internally using dibutyl phthalate as lock mass (m/z 279.1591), giving a mass accuracy below 1 ppm.

For non-targeted analyses, data were processed using XCMS package functioning under R. Raw data obtained from the mass spectrometer were converted in the mzXML format using MS converter before analysis. The settings of the `xcmsSet` function of the XCMS package were fixed as follow: `method to detect="centWave"`, `ppm=2`, `noise=50000`, `mzdiff=0.001`, `prefilter=c(5,15000)`, `snthresh=6`, `peakwidth=c(6,35)`. The peaks were aligned across all the samples using the followings settings of the function `group.density`: `bw =10`, `mzwid=0.0025`. The processed data were then exported as a .csv file for further data analysis. A first rough filter was performed to keep ions that were considered as specific, i.e. the minimum area value of *M. rotundifolia* was above the maximal value of *V. vinifera*. A targeted analysis was then performed to analyse the specific ions. Peak integration was performed through the Xcalibur software and, for compounds of interest, integration was checked manually before validation. Identification of detected ions was based on comparison of their mass spectrum and of their retention time in the same LC conditions to those of the authentic standards when available. The data are given as normalized peak area.

Genetic determinism analysis of M. rotundifolia leaf specific ions

For the QTL analysis, high-density parental genetic maps were previously established using GBS for the three BC populations (Delame et al., in prep.). For each population, two parental maps, one hybrid map and one *V. vinifera* map, were available. QTL analysis was carried out using the `R/qtl` package of the R software (version 3.3.2, © 2016 The R Foundation for Statistical Computing) (Broman et al., 2003). Data were transformed using the `log10` function for non-null data, null data being set to 0. We will call this dataset D_{\log} . Another dataset was created by keeping null data to 0 and transforming all the values above 0 in 1. We will call this dataset D_{bin} , for binary data. A third data set was finally established from the D_{\log} dataset setting all the null values as missing data. This dataset will be named D_{cond} , for conditional data. D_{\log} was analyzed with the 2-part model of the function `scanone`, D_{bin} with the binary model of the function `scanone` and D_{cond} with the marker-regression and interval mapping analyses (Broman, 2003). The significant LOD threshold for QTL detection at $\alpha=0.05$ for each linkage group was determined by 1,000 permutations of the phenotypic data for each model. Maximum LOD values were used to estimate genetic factor peak positions and the confidence intervals of QTL peaks were determined as the peak flanking regions in which LOD scores decline by one LOD.

Results

Variability and specificity of M. rotundifolia

A non-targeted analysis was performed on berries and leaves of *M. rotundifolia* and *V. vinifera* to determine metabolites specific to *M. rotundifolia*. Berries were studied with gas chromatography and leaves were studied with liquid chromatography. We distinguish highly specific ions and partially specific ions. An ion is considered as highly specific when the maximum of peak area detected in *V. vinifera* samples is 100-fold below the minimum of peak area detected in *M. rotundifolia* samples. An ion is considered as partially specific when the maximum of peak area detected in *V. vinifera* samples is below 10^5 and 10-fold below the minimum of peak area detected in *M. rotundifolia* samples.

GC-MS analysis allowed us to detect 23 free metabolites specific to *M. rotundifolia*, 9 highly specific and 14 partially specific, and 19 glycosidically bound metabolites specific to *M. rotundifolia*, 10

highly specific and 9 partially specific (Table 2). All but one metabolites were identified. Major part of the metabolites identified are esters (10) and alcohols (8).

LC-MS analysis was performed on leaves in positive and negative modes, i.e. with a positive or a negative ionization. Overall, 26 ions were detected as specific to *M. rotundifolia* (Table 3). Among them, 22 ions are highly specific, 10 in positive mode and 12 in negative mode, and 4 ions are partially specific, 3 in positive mode and 1 in negative mode. Given the high precision of mass detection, we were able to calculate the molecular formula of almost all the ions detected. M465T224 in positive mode and M463T226 in negative mode were identified as myricetin rhamnoside thanks to pure standard. M346T383 in positive mode and M551T384 in negative mode were tentatively identified as 3,4,3'-tri-*O*-methyllellagic acid glucoside.

Variability of leaf specific ions in the offspring populations

The 26 specific ions detected by LC-MS on leaves were studied in three pseudo-backcross populations using a targeted analysis. The ion M467T130 was absent in the BC1 population and did not segregate in any population. The study of M369T219 was not possible because of the presence of several ions of the same weight eluting almost at the same time. All other ions segregated in the BC1 population whereas only some ions segregated in the BC2 and BC4 populations. All the ions segregating in the populations displayed a similar distribution: in one part of the population, the ion was not detected and, in the other part, the ion was detected with a variable signal from an individual to another (Figure 1).

Genetic determinism of leaf ions specific to M. rotundifolia

Genetic determinism of ions that segregated in the populations was studied using high density genetic linkage maps previously established (Delame et al., in prep.). On these parental maps, the origin of each chromosome in the hybrids are known. Two different types of regions are present: homologous regions, where both alleles in a chromosome pair are inherited from *V. vinifera*, and homeologous regions, where one allele is inherited from *V. vinifera* and the other one from *M. rotundifolia*. The Two-part model of the scanone function in the R/qtl package was the most adapted model to fit the particular distribution of the ions in the studied populations. Thanks to this analysis, we detected two kinds of factors: qualitative factors of absence/presence of the ions in the individuals and quantitative factors which control the concentration of ions (Table 4). Out of the 63 factors detected throughout the three populations, 30 were qualitative factors and 33 were quantitative factors. All the 42 factors detected on the hybrid maps were in homeologous regions. The other 21 factors were detected on the *V. vinifera* maps. Only few regions in the hybrid maps were involved in the control of specific ions on chromosomes 6, 8, 11, 18.

According to the genetic architecture determining the production of each ion (qualitative or quantitative factor, on hybrid or on *V. vinifera* maps), we were able to distinguish eight cases. First, only one qualitative factor was detected in *M. rotundifolia* (M1035T158 and M813T221). Second, two qualitative factors were detected in *M. rotundifolia* (M991T156). Third, one qualitative factor and one or two quantitative factors were detected in *M. rotundifolia* (M833T79 and M845T342). Fourth, only quantitative factors were detected in *M. rotundifolia* and in *V. vinifera* (M845T221). Fifth, one qualitative factor was detected in *M. rotundifolia* and one quantitative factor in *V. vinifera* (M835T77, M835T96 and M1035T205). Sixth, one qualitative factor and one or two quantitative factors were detected in *M. rotundifolia* and 1 quantitative factor was detected in *V. vinifera* (M619T116, M455T224, M465T224, M346T383, M634T116, M559T223, M943T224, M463T226 and M551T384). Seventh, one qualitative factor was detected in *M. rotundifolia* and one qualitative factor was detected in *V. vinifera* (M991T205, M865T219 and M833T96). Eighth, one qualitative factor and one quantitative factor was detected in *M. rotundifolia* and a qualitative factor was detected in *V. vinifera*

Table 2: Free and glycosidically bound volatiles in berries specific to *M. rotundifolia*

Compound	ID ^a	RI ^b	Free			Bound		
			Normalized area (x10 ⁶)		Sp. ^c	Normalized area (x10 ⁶)		Sp. ^c
			<i>V. vinifera</i>	<i>M. rotundifolia</i>		<i>V. vinifera</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
Alcohols								
1,3-octanediol	MS, RI	2136	nd ^d	nd – 0.23	*	nd	nd – 0.62	*
1-octanol	MS, RI, Std	1570	nd	0.28 – 16.45	**	0.02 – 0.15	0.68 – 34.61	.
5-octen-1-ol	MS, RI	1628	nd	nd – 0.86	*	nd	nd – 1.46	*
1-phenyl-1,2-ethanediol (styreneglycol)	MS, RI	2547	nd	0.19 – 5.08	**	nd	0.14 – 1.37	**
3-nonen-1-ol	MS, RI	1694	nd	nd – 0.81	*	nd	nd – 1.32	*
4-decen-1-ol	MS, RI	1803	nd	0.17 – 20.57	**	nd	0.18 – 28.32	**
4-methoxybenzenepropanol	MS, RI	2464	nd	0.03 – 0.62	**	nd	0.03 – 4.91	**
4-methoxybenzyl alcohol (anisyl alcohol)	MS, RI	2274	nd	nd – 0.59	*	nd	0.03 – 0.33	**
Aldehydes								
Benzaldehyde	MS, RI, Std	1531	nd	0.23 – 4.21	**	0.06 – 4.29	0.12 – 0.62	.
Phenylacetaldehyde	MS, RI, Std	1646	0.06 – 1.53	0.98 – 16.78	.	nd	0.48 – 12.48	**
Esters								
Benzyl acetate	MS, RI	1733	nd	nd – 0.47	*	nd	nd	.
Butyl-3-hydroxybutanoate	MS, RI	1713	nd	0.18 – 0.80	**	nd	0.07 – 11.57	**
Ethyl-2-butenate	MS, RI	1985	nd	0.14 – 0.72	**	nd	0.07 – 4.20	**
Ethyl-3-hydroxybutanoate	MS, RI	1529	nd	nd – 1.48	*	nd	0.05 – 0.14	**
Ethyl acetate	MS, RI	1700	nd	nd – 5.59	*	nd	nd – 1.06	*
Ethyl cinnamate	MS, RI, Std	2125	nd	nd – 0.64	*	nd	nd – 11.23	*
2-phenylethyl ester	MS	2108	nd	nd – 3.83	*	nd	nd	.
2-phenylethyl ester	MS	2127	nd	nd – 3.37	*	nd	nd – 9.47	*
2-phenylethyl ester	MS	2511	nd	nd – 1.01	*	nd	nd – 1.62	*
2-phenylethyl acetate	MS, RI, Std	1816	nd	nd – 22.11	*	nd	nd	.
Furanones								
2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (furanol)	MS, RI, Std	2035	nd	nd – 3.79	*	nd – 0.69	nd – 1.3	.
Ketones								
o-aminoacetophenone	MS, RI	2208	nd	0.05 – 0.63	**	nd	0.03 – 0.22	**
Acids								
Homovanillic acid	MS, RI	2912	nd	0.04 – 0.53	**	nd	nd – 0.81	*
Miscellaneous								
Benzeneacetonitrile	MS, RI	1920	nd	nd – 1.01	*	nd	0.04 – 0.26	**
Unknown			nd	nd	.	nd	nd – 0.83	*

^a Identification criteria were based on mass spectra matching with the standard NIST-14 library (MS), comparison of the retention index (RI), and comparison to authentic standard (Std); ^b RI = Retention index; ^c Specificity (** = highly specific, * = partially specific, . = not specific); ^d nd = Not detected.

Table 3: Non-volatile metabolites in leaves specific to *M. rotundifolia*

Link ^a	Ions	RT ^b	Mass (g/mol)	Molecular formula ^c	Proposed detected adduct	Normalized area (x10 ⁶)		Sp. ^d
						<i>V. vinifera</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
Positive mode								
1	M835T77	1.28	835.08344	C34 H27 O25	[M+H] ⁺	nd ^e	0.10 – 1.25	**
2	M835T96	1.60	835.08380	C34 H27 O25	[M+H] ⁺	nd	0.14 – 1.44	**
3	M619T116	1.93	619.09302	C27 H23 O17	[M-H2O+H] ⁺	nd	0.21 – 4.90	*
4	M467T130	2.16	467.08209	C20 H19 O13	[M+H] ⁺	nd	0.04 – 9.45	**
5	M991T156	2.60	991.08929	C40 H31 O30	[M+H] ⁺	nd	0.32 – 2.77	**
6	M991T205	3.41	991.08929	C40 H31 O30	[M+H] ⁺	nd	0.31 – 4.85	**
7	M369T219	3.65	369.04529	C15 H13 O11	[M+H] ⁺	nd	0.22 – 1.38	*
8	M865T219	3.65	865.09412	C35 H29 O26	[M+H] ⁺	nd	0.06 – 1.43	**
11	M559T223	3.78	559.04112	C17 H19 O21	[M+H] ⁺	nd	0.19 – 1.29	**
12	M455T224	3.78	455.01747	-	[M+H] ⁺	nd	0.18 – 0.94	*
13	M465T224	3.78	465.10280	C21 H21 O12	[M+H] ⁺	nd	27.84 – 191.39	**
14	M943T224	3.78	943.17781	C42 H39 O25	[M+H] ⁺	nd	0.15 – 3.42	**
18	M346T383	6.38	345.06046	C17 H13 O8	[M+H] ⁺	nd – 0.01	4.64 – 15.48	**
Negative mode								
1	M833T79	1.31	833.06989	C34 H25 O25	[M-H] ⁻	nd	0.13 – 1.69	**
2	M833T96	1.60	833.07001	C34 H25 O25	[M-H] ⁻	nd	0.12 – 1.43	**
3	M634T116	1.92	635.08923	C27 H23 O18	[M-H] ⁻	nd	0.18 – 8.28	**
5	M1035T158	2.63	1035.07202	C41 H31 O32	[M+CH2O2-H] ⁻	nd	0.06 – 4.82	**
6	M1035T205	3.41	1035.07153	C41 H31 O32	[M+CH2O2-H] ⁻	nd	0.44 – 7.92	**
9	M813T221	3.65	813.04340	C34 H21 O24	[M-H] ⁻	nd – 0.02	0.51 – 9.28	**
10	M845T221	3.65	845.06158	C35 H25 O25	[M-H2O-H] ⁻	nd – 0.07	1.64 – 35.00	**
13	M463T226	3.78	463.08823	C21 H19 O12	[M-H] ⁻	nd	33.31 – 168.53	**
14	M941T227	3.78	941.16351	C42 H37 O25	[M-H] ⁻	nd – 0.01	0.10 – 1.76	*
15	M845T237	3.97	845.06946	C35 H25 O25	[M-H] ⁻	nd – 0.07	1.04 – 53.95	**
16	M845T342	5.68	845.06996	C35 H25 O25	[M-H] ⁻	nd	0.02 – 5.07	**
17	M859T343	5.69	859.08563	C36 H27 O25	[M-H] ⁻	nd	0.08 – 2.47	**
18	M551T384	6.40	551.09918	C24 H23 O15	[M+CH2O2-H] ⁻	nd	1.36 – 4.39	**

^a Link between ions in positive and negative modes; ^b RT = Retention time (min); ^c Molecular formulas were established from the precise mass \pm 1ppm; ^d Specificity (** = highly specific, * = partially specific); ^e nd = Not detected.

Figure 1: Distributions of the relative abundance of the ions detected in the BC1 in the vineyard (a) and in the greenhouse (b), in the BC2 (c) and in the BC4 (d). Concentration on x-axis are expressed in log(Normalized area).

a.

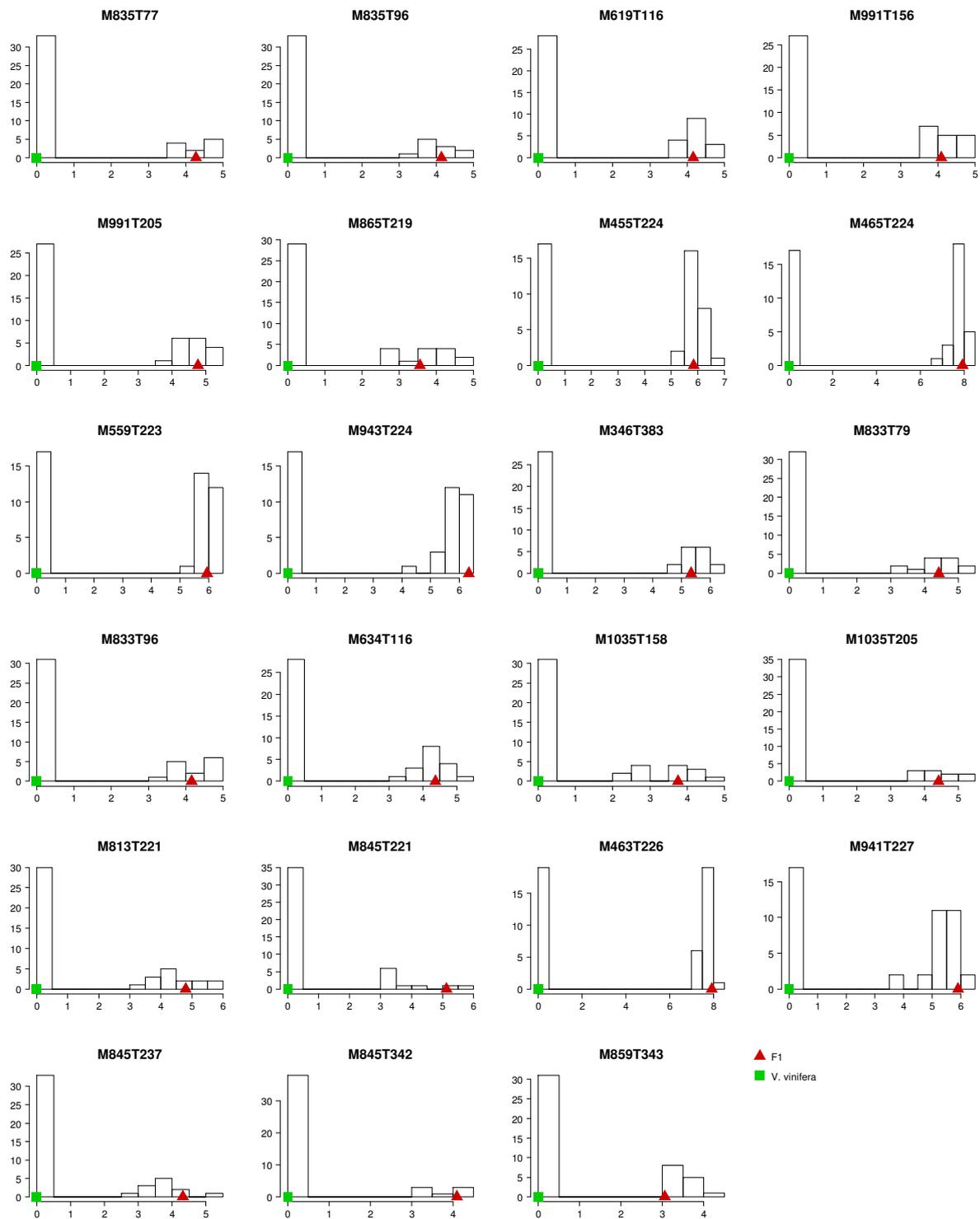


Figure 1 (continued)

b.

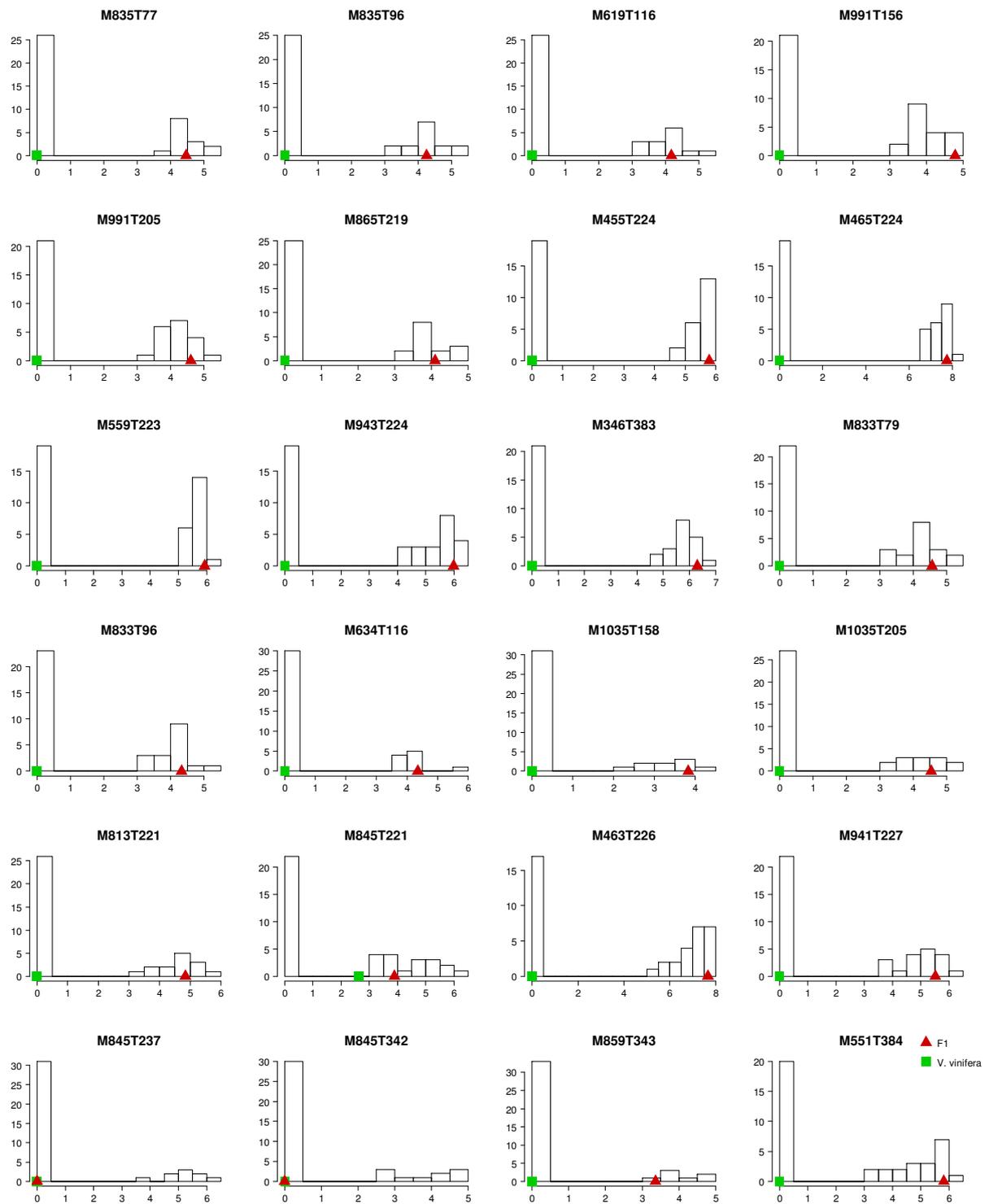
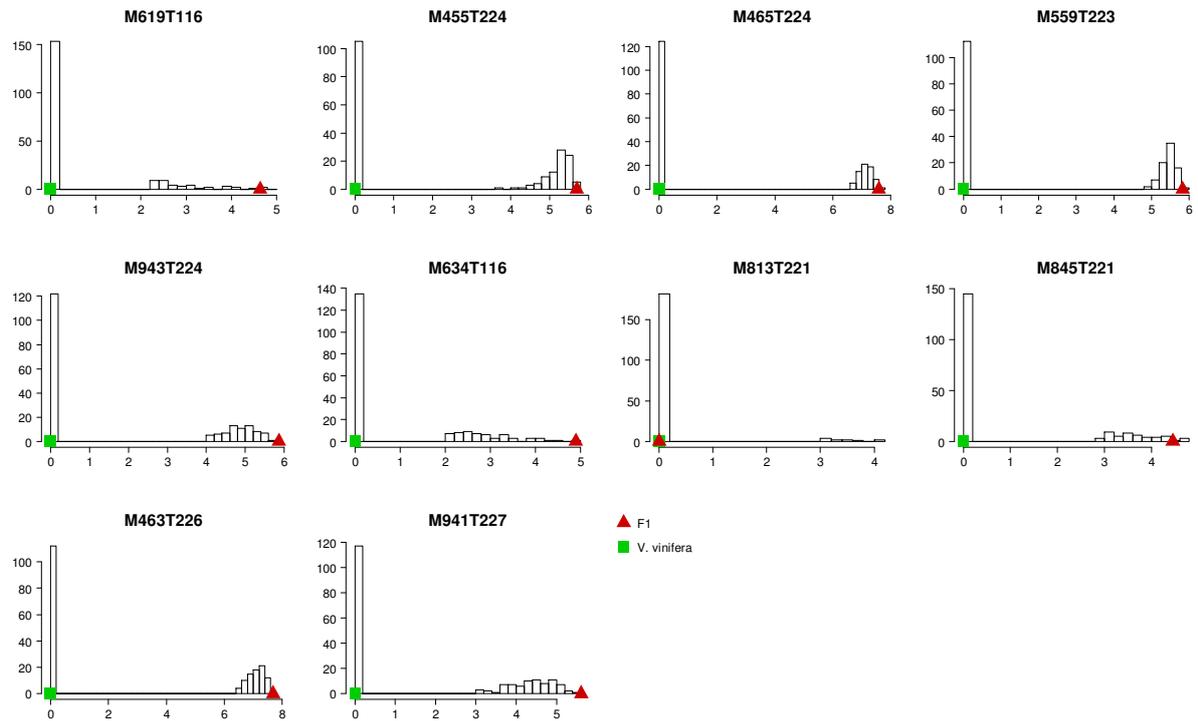


Figure 1 (continued)

C.



d.

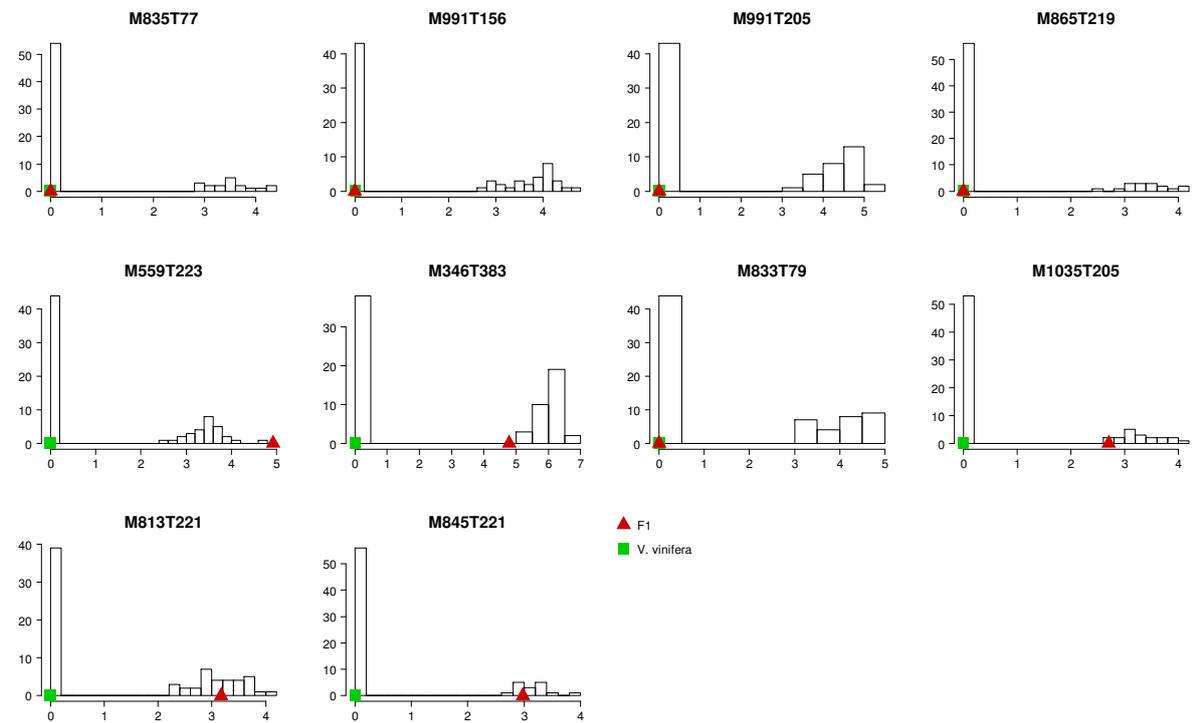


Table 4: Characteristics of the qualitative and quantitative factors detected for the metabolites specific to *M. rotundifolia* in leaves

Ion	Pop ^a	Chr ^b	Pos ^c	Nearest marker	1-LOD interval	LOD score	Type ^d	PV ^e	Origin ^f
M835T77	BC1-in	5	91.99	S5_23616349	90.32 – 93.49	4.19	cond	74.78	Vv ♂
	BC4	18	42.63	VVlu04	3.00– 45.22	3.72	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	68.91	S18_22553835	61.44 – 71.94	6.49	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	74.92	S18_26558714	65.00 – 77.00	6.43	bin		Mr (+)
M835T96	BC1-in	5	91.99	S5_23616349	60.00 – 93.49	2.97	cond	59.80	Vv ♂
	BC1-in	18	68.91	S18_22553835	61.44 – 71.94	7.25	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	74.92	S18_26558714	65.00 – 77.00	6.43	bin		Mr (+)
M619T116	BC1-out	8	37.57	S8_12828698	24.09 – 54.00	4.48	cond	72.44	Mr (+)
	BC2	11	54.81	S11_8037837	53.86 – 57.67	7.56	bin		Mr (+)
	BC1-in	11	56.00	S11_16680458	49.00 – 61.00	5.42	bin		Mr (+)
	BC1-out	11	55.26	S11_16680458	49.00 – 61.00	6.05	bin		Mr (+)
	BC1-out	13	51.00	S13_6918763	46.00 – 73.84	3.57	cond	64.16	Vv ♂
	BC1-out	5	55.46	S5_17287886	45.30 – 70.00	3.43	bin		Vv ♂
M991T156	BC4	18	43.00	VVlu04	41.33 – 45.00	14.12	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	65.92	S18_14528092	61.44 – 68.91	10.3	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	65.92	S18_14528092	64.43 – 68.91	11.1	bin		Mr (+)
	BC4	2	25.00	S2_6636409	18.00 – 25.94	3.47	cond	42.34	Vv ♂
M991T205	BC1-out	5	55.46	S5_17287886	45.30 – 70.00	3.43	bin		Vv ♂
	BC4	18	43.93	S18_17294492	42.63 – 45.22	13.4	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	65.92	S18_14528092	61.44 – 68.91	10.3	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	65.92	S18_14528092	64.43 – 68.91	11.1	bin		Mr (+)
	BC1-out	15	28.00	S15_14777500	23.00 – 43.53	3.42	bin		Vv ♂
M865T219	BC4	18	42.63	VVlu04	41.33 – 45.00	6.08	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	65.92	S18_14528092	62.00 – 76.00	8.74	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	68.91	S18_22553835	61.44 – 71.94	7.25	bin		Mr (+)
	BC2	6	20.63	S6_14731941	19.71 – 21.10	53.2	bin		Mr (+)
M455T224	BC2	6	21.56	S6_20232096	20.63 – 27.89	8.07	cond	34.46	Mr (+)
	BC1-in	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.70	12	bin		Mr (+)
	BC1-out	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.70	12.7	bin		Mr (+)
	BC1-in	6	41.54	S6_15514212	35.02 – 47.00	3.53	cond	53.88	Vv ♂
	BC1-out	6	43.51	S6_15882449	33.53 – 59.00	2.57	cond	35.51	Vv ♂
	BC1-in	18	6.00	S18_2416996	5.00 – 10.00	8.24	cond	83.59	Mr (+)
	BC1-out	18	29.00	S18_6400533	10.00 – 48.00	3.38	cond	43.80	Mr (+)
	BC2	6	22.02	S6_20502801	20.63 – 25.00	37.2	bin		Mr (+)
M465T224	BC1-in	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.70	12	bin		Mr (+)
	BC1-out	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.70	12.7	bin		Mr (+)
	BC1-out	6	36.52	S6_9017382	34.00 – 56.00	3.04	cond	40.50	Vv ♂
	BC1-in	6	41.54	S6_15514212	35.02 – 48.00	3.38	cond	52.38	Vv ♂
	BC1-in	18	6.00	S18_2416996	5.00 – 25.43	7.07	cond	78.79	Mr (+)
	BC1-out	18	29.00	S18_6400533	11.93 – 43.00	4.24	cond	51.47	Mr (+)
	BC2	6	22.02	S6_20465206	20.63 – 22.48	38	bin		Mr (+)
	BC1-in	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.70	12	bin		Mr (+)
M559T223	BC1-out	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.70	12.7	bin		Mr (+)
	BC1-out	6	36.52	S6_9017382	34.00 – 55.00	2.88	cond	38.81	Vv ♂
	BC1-in	6	42.00	S6_15514212	35.02 – 43.51	3.61	cond	54.73	Vv ♂
	BC4	12	24.00	S12_3882225	22.00 – 36.00	3.55	cond	44.23	Vv ♂
	BC1-in	18	23.00	S18_5351908	5.00 – 25.423	7.75	cond	81.73	Mr (+)
	BC1-out	18	29.00	S18_6400533	11.93 – 43.00	5.71	cond	62.22	Mr (+)
	BC2	6	22.02	S6_20502801	20.63 – 25.00	39	bin		Mr (+)
M943T224	BC1-in	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.70	12	bin		Mr (+)
	BC1-out	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.70	12.7	bin		Mr (+)
	BC1-in	6	41.54	S6_15514212	35.02 – 49.00	3.17	cond	50.13	Vv ♂
	BC1-out	6	43.51	S6_15882449	33.53 – 56.00	2.82	cond	38.20	Vv ♂
	BC1-in	18	23.00	S18_5351908	5.00 – 41.94	7.64	cond	81.27	Mr (+)
	BC1-out	18	29.00	S18_6400533	10.44 – 43.00	3.71	cond	46.89	Mr (+)
	BC1-out	2	2.00	S2_1968930	0.00 – 4.00	3.91	cond	67.55	Vv ♂
M346T383	BC4	18	46.52	chr18_2000	45.22 – 47.82	21.6	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	71.94	S18_23306994	69.00 – 73.43	12	bin		Mr (+)

Ion	Pop ^a	Chr ^b	Pos ^c	Nearest marker	1-LOD interval	LOD score	Type ^d	PV ^e	Origin ^f
	BC1-out	18	74.92	S18_26392300	69.00 – 77.00	12.5	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	77.95	S18_28125887	75.00 – 90.00	3.40	cond	56.17	Mr (+)
M833T79	BC4	18	42.00	S18_14561301	16.92 – 46.00	3.78	cond	46.33	Mr (+)
	BC4	18	42.63	VVlu04	40.03 – 45.22	5.93	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	65.92	S18_14528092	61.00 – 68.91	9.13	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	65.92	S18_14528092	61.00 – 68.91	6.6	bin		Mr (+)
	BC1-out	5	55.46	S5_17287886	44.00 – 58.44	3.18	bin		Vv ♂
M833T96	BC1-in	5	84.00	S5_21825388	59.00 – 90.00	4.24	bin/var		Vv ♂
	BC1-out	18	65.92	S18_14528104	61.00 – 68.91	7.36	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	67.41	S18_19962004	60.00 – 68.91	8.17	bin		Mr (+)
	BC1-in	6	1.00	S6_1564729	0.00 – 10.00	4.07	cond	84.67	Vv ♂
M634T116	BC1-out	8	37.57	S8_12828698	36.08 – 56.47	3.79	cond	64.20	Mr (+)
	BC2	11	54.81	S11_8037837	53.86 – 57.67	7.56	bin		Mr (+)
	BC1-in	11	55.26	S11_16680458	10.00 – 65.42	3.59	bin		Mr (+)
	BC1-out	11	55.26	S11_16680458	49.00 – 62.00	6.42	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	67.41	S18_19322143	61.00 – 68.91	5.13	bin		Mr (+)
M1035T158	BC1-in	18	68.91	S18_22553835	53.00 – 71.94	3.55	bin		Mr (+)
	BC4	18	45.22	S18_20781924	42.63 – 46.52	7.56	bin		Mr (+)
M1035T205	BC1-out	18	67.00	S18_13869709	60.00 – 98.42	2.55	cond	69.11	Vv ♂
	BC1-in	18	67.41	S18_19962004	55.00 – 91.53	5.33	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	68.91	S18_22644153	58.00 – 71.94	4.98	bin		Mr (+)
	BC1-out	18	65.92	S18_14528104	61.44 – 68.91	5.84	bin		Mr (+)
M813T221	BC1-in	18	68.91	S18_22553835	57.00 – 71.94	4.36	bin		Mr (+)
	BC1-in	8	17.00	S8_7109898	4.00 – 21.00	3.65	cond	60.70	Vv ♂
M845T221	BC1-in	18	71.94	S18_23665379	67.41 – 90.00	4.62	cond	69.37	Mr (+)
	BC2	6	20.00	S6_13283890	11.00 – 22.00	23.4	bin		Mr (+)
M463T226	BC1-in	6	29.00	S6_12148229	28.00 – 37.00	9.14	cond	83.97	Mr (+)
	BC1-out	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.00	10.2	bin		Mr (+)
	BC1-in	6	37.70	S6_16766768	30.00 – 48.00	3.9	bin		Mr (+)
	BC1-out	6	43.51	S6_15882449	35.02 – 57.00	3.11	cond	40.08	Vv ♂
	BC1-in	6	44.00	S6_15868398	35.02 – 45.00	4.06	cond	55.65	Mr (+)
	BC1-out	18	29.00	S18_6400533	27.00 – 43.43	5.14	cond	59.73	Mr (+)
	BC2	6	20.00	S6_13283890	11.00 – 25.00	19.7	bin		Mr (+)
M941T227	BC1-in	6	33.08	S6_15006138	28.00 – 39.20	8.21	bin		Mr (+)
	BC1-out	6	33.08	S6_15006138	30.00 – 37.00	13	bin		Mr (+)
	BC1-in	6	41.54	S6_15514212	37.00 – 52.00	4.24	bin/var		Vv ♂
	BC1-in	18	2.00	S18_375293	1.00 – 2.93	6.38	cond	80.45	Mr (+)
	BC1-out	18	42.00	S18_9948506	5.00 – 43.43	3.45	cond	43.27	Mr (+)
	BC1-out	6	29.98	S6_11922831	27.00 – 36.00	5.13	bin		Mr (-)
M845T237	BC1-in	18	82.43	S18_30235939	75.00 – 91.00	4.88	bin		Mr (+)
	BC1-in	8	28.00	S8_10752318	27.08 – 30.00	4.55	cond	87.69	Mr (+)
M845T342	BC1-out	11	59.00	S11_16680458	55.26 – 63.00	4.76	cond	95.63	Mr (+)
	BC1-out	18	71.94	S18_23039493	49.00 – 77.95	3.45	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	75.00	VVin16	58.00 – 86.91	4.4	bin		Mr (+)
	BC1-in	11	43.00	VVin35a	34.00 – 65.42	3.10	cond	87.00	Mr (+)
M859T343	BC1-out	15	49.97	S15_17368623	26.00 – 56.00	3.51	bin		Vv ♂
	BC1-out	18	65.92	S18_14528104	61.44 – 77.00	7.36	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	82.43	S18_30235939	68.00 – 91.00	3.55	bin		Mr (+)
	BC1-in	2	2.00	S2_1968930	0.00 – 4.00	5.56	cond	72.23	Vv ♂
M551T384	BC1-in	18	58.45	S18_12887803	55.00 – 61.00	5.52	bin		Mr (+)
	BC1-in	18	88.00	S18_33867128	72.00 – 91.00	6.06	cond	75.21	Mr (+)

^a Plant population; ^b Chromosome; ^c Peak position (cM); ^d Type of factor (bin = qualitative factor, cond = quantitative factor); ^e Percentage of phenotypic variance explained; ^f Origin of the QTL (Vv ♂ = QTL detected on the *V. vinifera* map, Vv ♀ = QTL detected on the hybrid map in an homologous region, Mr (+) = QTL detected on the hybrid map in an homeologous region, *M. rotundifolia*'s allele having the effect expected, Mr (-) = QTL detected on the hybrid map in an homeologous region, *M. rotundifolia*'s allele having the reverse effect)

(M941T227 and M859T343). The percentage of explained phenotypic variance was calculated for quantitative factor, taking into account only the variable part of the distribution. It ranged between 34.4% (M455T224) and 95.6% (M845T342).

Discussion

M. rotundifolia is a species of first interest for grape breeding because of its multiple resistances to major diseases. However, this grapevine related species harbour volatile aroma compounds and other metabolites that make it absolutely not adapted to traditional European viticulture and high quality wine production. In order to better control these unwanted metabolites in the breeding process, we compared *M. rotundifolia* and *V. vinifera* to determine the metabolites specific to *M. rotundifolia* and we analysed their genetic determinism. Our study, which is the first one addressing these questions, allowed us to find new metabolites involved in aroma, aroma potentiality or specificity of *M. rotundifolia* and to detect factors controlling the expression of these metabolites.

Free and glycosidically bound volatiles specific to M. rotundifolia

Free and glycosidically bound volatiles are responsible for the flavour of berries and wines. Given that, it is of first interest to determine which compounds are specific to *M. rotundifolia*. The comparison of free and glycosidically bound volatiles present in berries of *M. rotundifolia* and *V. vinifera* allowed us to find 25 compounds specific to *M. rotundifolia* (Table 3). Among the volatiles previously detected as aroma-active compounds of the characteristic flavour of *M. rotundifolia*, we detected *o*-aminoacetophenone and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (furaneol) respectively responsible for foxy and candy-like aroma notes of *M. rotundifolia* grapes (Baek *et al.*, 1997; Baek & Cadwallader, 1999). *O*-aminoacetophenone is highly specific because of its absence in *V. vinifera* and its presence in all *M. rotundifolia* samples in both free and bound forms. It has previously been described as responsible for untypical aging off-flavour in wines (Balboa-Lagunero *et al.*, 2011; Mihaljević Žulj *et al.*, 2014). During fermentation, *o*-aminoacetophenone is synthesized from tryptophan by the yeast (Schneider, 2014). Furaneol was not detected in free form in the samples of *M. rotundifolia* cv. Regale and is thus considered as partially specific. Moreover, it was detected in bound form in the sample of *V. vinifera* cv. Muscat d'Alexandrie and cannot be considered as specific. Furaneol has already been described in grapes in bound form (Genovese *et al.*, 2013) and in wines in free and bound forms (Botelho *et al.*, 2010). Indeed, volatiles are stocked under glycosidically bound forms as aroma precursors and released by hydrolysis during winemaking (Sefton, 1998; Sefton *et al.*, 1993; Sefton *et al.*, 1994). Here, furaneol seems to be involved in the flavour of the grape of *M. rotundifolia* but this flavour can also be found in wine from *V. vinifera*.

Of the 11 volatiles detected having a phenyl moiety, seven have their biosynthesis pathway elucidated in plants: anisyl alcohol (Lapadatescu *et al.*, 2000), benzaldehyde (Kambiranda *et al.*, 2016; Lapadatescu *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2017), phenylacetaldehyde (Lapadatescu *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2017), benzyl acetate (Oliva *et al.*, 2017), ethyl cinnamate (Latza *et al.*, 1996; Shimizu & Kojima, 1984), 2-phenylethyl acetate (Shalit *et al.*, 2001) and benzeneacetonitrile (Kato *et al.*, 2000; Wittstock & Halkier, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2014). All of them are products of the phenylalanine metabolism.

Non-volatile metabolites specific to M. rotundifolia in leaves and berries

The presence of some metabolites specific of *M. rotundifolia*, in the leaves of new varieties, could hamper the use of these varieties, even if these metabolites are not involved in the flavour of the wine. They are recognized as markers of the presence of American grapes. The comparison of non-volatile metabolites in leaves and berries of *M. rotundifolia* and *V. vinifera* allowed us to find 26 ions in leaves and 124 ions in berries specific to *M. rotundifolia* (Table 2). Two metabolites corresponding

to four ions, two in positive mode and two in negative mode, were identified or tentatively identified as myricetin rhamnoside and 3,4,3'-tri-O-methylellagic acid glucoside, respectively. Myricetin is a flavonol synthesized by the phenylpropanoid pathway, from phenylalanine, in a lot of plants (Flamini et al., 2013). Myricetin has already been described in red grapes from *V. vinifera* (Mattivi et al., 2006) and in grapes from *M. rotundifolia* (Talcott & Lee, 2002). This metabolite is mainly found in grapes in its glycosidically bound forms, such as myricetin 3-O-glucoside or myricetin 3-O-galactoside (Castillo-Muñoz et al., 2009). However, myricetin rhamnoside has never been found in *V. vinifera* grape. On the contrary, a previous study tentatively identified this metabolite in berries of *M. rotundifolia* (Sandhu & Gu, 2010). 3,4,3'-tri-O-methylellagic acid glucoside is derived from ellagic acid, a precursor of hydrolysable tannins. This class of compounds has been reported to accumulate mainly in *M. rotundifolia* and also in other American species of *Vitis* (Narduzzi et al., 2015). On the contrary, few hydrolysable tannins or precursors have been reported in *V. vinifera* grapes (Narduzzi et al., 2015). The lack of commercial standards for this class of compound did not allow us to confirm the identification proposed. In addition, we were not able to identify several ions detected in leaves as specific to *M. rotundifolia*. However, thanks to the high precision and the accuracy of the mass spectrometer, we were able to determine their molecular formula and isotopic profile, which is particular with a high ratio of oxygen and a low ratio of hydrogen with respect to the number of carbon. This kind of molecular formula is a feature of ellagitannins, metabolites derived from gallic acid. Given the high specificity of this class of compounds in *M. rotundifolia* against *V. vinifera*, we can hypothesize that some of the unidentified ions are ellagitannins (Narduzzi et al., 2015; Zhu et al., 2012).

Genetic determinism of leaf ions specific to M. rotundifolia

Knowing the genetic determinism of specific metabolites is important to help their elimination in breeding programs. In our study, we analysed the transmission of 26 metabolites of the leaves specific to *M. rotundifolia*. We were able to establish the genetic determinism of 24 metabolites through the detection of 63 factors involved in their control (Table 4).

The control of these metabolites is highly interesting because it involves systematically at least one qualitative factor responsible for the absence or the presence of the metabolite, and one or several quantitative factors responsible of the concentration variation of the metabolite. This kind of double control has previously been described in roses for the control of petal coloration by anthocyanin contents and grapevine for the control of terpenol content. For roses, studies showed that a major qualitative factor controls the difference between pink and white roses, and quantitative factors control the quantity of anthocyanins in rose petals, thus influencing their coloration (Debener & Mattiesch, 1999; Henz et al., 2015). For grapevine, Duchene et al (2009) showed that a major factor controls the presence or absence of monoterpene in berries while a quantitative factor controls the balance between linalool and geraniol, both influencing the berry taste.

Interestingly, when the qualitative factor controls the absence of the metabolite, the quantitative factor cannot be expressed. In the context of a breeding program, eliminating the qualitative factor is sufficient to eliminate the metabolite from the leaves. These qualitative factors are probably involved in the synthesis of enzyme catalysing one crucial step in the biosynthesis pathway of the metabolite, and controlling the presence or the absence of this specific metabolite in the leaf. On the contrary, quantitative factors may be involved in the control of the level of the transcription, the activity of some enzymes of the pathway or in the flux variation (Eanes, 2017).

Surprisingly, all the 24 qualitative factors detected are distributed in only three major homeologous regions, on chromosomes 6, 11 and 18. Moreover, several ions have a very similar genetic control: M455T224, M465T224, M559T223 and M943T224 are all controlled by one qualitative factor of a homeologous region of on chromosome 6 in a homeologous region, one quantitative factor on chromosome 6 on a *V. vinifera* map and one quantitative factor on chromosome 18 in a

homeologous region. M465T224 was identified as myricetin rhamnoside. Given the identical retention time of the other ions, we assume that they are products of the same metabolite which have formed bonds during ionization. On the contrary, M835T77 and M835T96 have different retention times but their genetic control are also similar: one qualitative factor on chromosome 18 in a homeologous region and one quantitative factor on chromosome 5 on the *V. vinifera* map. The phenomenon is the same for M991T156 and M991T205 which are both controlled by a qualitative factor on chromosome 18 in a homeologous region and one quantitative factor on chromosome 5 on the *V. vinifera* map, but with different retention times. We hypothesize that these couples of ions are not products of the same metabolites but are probably produced by the same metabolomics pathways. They may be isomers of the same molecule.

The aim of the introgression of resistance factors from *M. rotundifolia* into *V. vinifera* is to introduce these resistance factors while eliminating factors responsible for unwanted traits. In our study, we showed that several metabolites specific to *M. rotundifolia* in the leaf are controlled by qualitative factors located in the regions of resistance genes. This means that separating resistance factors from these qualitative factors will be very difficult. Indeed, the probability of having one recombination between the two factors is very low and the elimination of such factors will require the generation of large size populations.

Conclusion

By comparing several accessions of *V. vinifera* and *M. rotundifolia*, we detected metabolites of leaves and berries specific to *M. rotundifolia*. Furaneol and o-aminoacetophenone, which are known to be involved in the particular taste of *M. rotundifolia* were detected as specific in our study. Major part of the volatiles detected in berries as specific were products of the phenylalanine metabolism. Myricetin rhamnoside, 3,4,3'-tri-O-methylellagic acid glucoside and other ellagic acid derivatives were identified or tentatively identified in leaves as specific to *M. rotundifolia*. Identification of metabolites in leaves was supported by LC-MS and genetic determinism analyses. Few regions were involved in the control of these specific metabolites but chromosome 18 appears to have a strong impact. Knowing genetic determinism of metabolites specific to *M. rotundifolia* will greatly improve breeding programs using *M. rotundifolia* by selecting the best individuals in each progeny.

Author Contributions: D. M. conceived the original research plans, raised the funding and supervised the study. R. B. and P. C. supervised the experiments with LC-MS and GC-MS, respectively; M. D. performed most of the experiments. P. C. and M. D. performed the data analysis in GC-MS; R. B. and M. D. performed the data analysis in LC-MS. M. D. and D. M. wrote the article with contributions of all the authors.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the Fondation Jean Poupelain for funding our work through the HealthyGrape2 program. We thank, V. Dumas and J. Misbach for excellent assistance in plant maintenance and growing and N. Jaegli for the help on berries extractions.

References

- Baek H. H., Cadwallader K. R., 1999. Contribution of free and glycosidically bound volatile compounds to the aroma of muscadine grape juice. *Journal of Food Science*, 64 (3), 441-444.
- Baek H. H., Cadwallader K. R., Marroquin E., Silva J. L., 1997. Identification of predominant aroma compounds in muscadine grape juice. *Journal of Food Science*, 62 (2), 249-252.

- Balboa-Lagunero T., Arroyo T., Cabellos J. M., Aznar M., 2011. Sensory and olfactometric profiles of red wines after natural and forced oxidation processes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62 (4), 527-535.
- Barker C. L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M. B., Bouquet A., Adam-Blondon A. F., Thomas M. R., Dry I., 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (2), 370-377.
- Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Dumas V., Mestre P., Merdinoglu D., 2012. A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 125 (8), 1663-1675.
- Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E.H., Mestre P., Merdinoglu D., 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 123 (1), 43-53.
- Botelho G., Mendes-Faia A., Clímaco M. C., 2010. Characterisation of free and glycosidically bound odourant compounds of Aragonez clonal musts by GC-O. *Analytica Chimica Acta*, 657 (2), 198-203.
- Bouquet A., 1981. Resistance to grape fanleaf virus in muscadine grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Disease*, 65 (10), 791-793.
- Broman K. W., 2003. Mapping quantitative trait loci in the case of a spike in the phenotype distribution. *Genetics*, 163 (3), 1169-1175.
- Broman K. W., Wu H., Sen S., Churchill G. A., 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19 (7), 889-890.
- Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso S., García-Romero E., Gómez M. V., Velders A. H., Hermosín-Gutiérrez I., 2009. Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (1), 209-219.
- Debener T., Mattiesch L., 1999. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99 (5), 891-899.
- Delame M., Gazon M., Dumas V., Duchene E., Merdinoglu D. Comparative analysis of *Vitis vinifera* and *Muscadinia rotundifolia* for traits related to phenology and morphology, and genetic control of *M. rotundifolia*'s specific traits
- Delame M., Prado E., Blanc S., Robert G., Mestre P., Rustenholz C., Merdinoglu D. Introgression reshapes recombination distribution in grapevine interspecific hybrids.
- Duchêne E., Legras J. L., Karst F., Merdinoglu D., Claudel P., Jaegli N., Pelsy F., 2009. Variation of linalool and geraniol content within two pairs of aromatic and non-aromatic grapevine clones. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15 (2), 120-130.
- Eanes W. F., 2017. New views on the selection acting on genetic polymorphism in central metabolic genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1389, 108-123.
- Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One*, 6 (5), e19379.
- Flamini R., De Rosso M., Bavaresco L., 2015. Study of grape polyphenols by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF) and suspect screening analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 350259.

- Flamini R., Mattivi F., Rosso M. D., Arapitsas P., Bavaresco L., 2013. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10), 19651-19669.
- Genovese A., Lamorte S. A., Gambuti A., Moio L., 2013. Aroma of Aglianico and Uva di Troia grapes by aromatic series. *Food Research International*, 53, 15-23.
- Henz A., Debener T., Linde M., 2015. Identification of major stable QTLs for flower color in roses. *Molecular Breeding*, 35 (10), 190.
- Jánváry L., Hoffmann T., Pfeiffer J., Hausmann L., Töpfer R., Fischer T. C., Schwab W., 2009. A double mutation in the anthocyanin 5-O-glucosyltransferase gene disrupts enzymatic activity in *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (9), 3512-3518.
- Kambiranda D., Basha S. M., Singh R. K., He H., Calvin K., Mercer R., 2016. In Depth Proteome Analysis of Ripening Muscadine Grape Berry cv. Carlos Reveals Proteins Associated with Flavor and Aroma Compounds. *Journal of Proteome Research*, 15 (9), 2910-2923.
- Kato Y., Nakamura K., Sakiyama H., Mayhew S. G., Asano Y., 2000. Novel heme-containing lyase, phenylacetaldoxime dehydratase from *Bacillus* sp. strain OxB-1: purification, characterization, and molecular cloning of the gene. *Biochemistry*, 39 (4), 800-809.
- Lapadatescu C., Giniès C., Le Quéré J. L., Bonnarme P., 2000. Novel Scheme for Biosynthesis of Aryl Metabolites from L-Phenylalanine in the Fungus *Bjerkandera adusta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4), 1517-1522.
- Latza S., Ganßer D., Berger R. G., 1996. Carbohydrate esters of cinnamic acid from fruits of *Physalis peruviana*, *Psidium guajava* and *Vaccinium vitis-idaea*. *Phytochemistry*, 43 (2), 481-485.
- Marguerit E., Boury C., Manicki A., Donnart M., Butterlin G., Némorin A., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Ollat N., Decroocq S., 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 118 (7), 1261-1278.
- Mattivi F., Guzzon R., Vrhovsek U., Stefanini M., Velasco R., 2006. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20), 7692-7702.
- Mazucca P., Ferranti P., Picariello G., Chianese L., Addeo F., 2005. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40 (1), 83-90.
- Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Coste P., Dumas V., Haetty S., Butterlin G., Greif C., 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Horticulturae*, 603, 451-456.
- Mihaljević Žulj M., Maslov L., Tomaz I., Jeromel A., 2015. Determination of 2-aminoacetophenone in white wines using ultrasound assisted SPME coupled with GC-MS. *Journal of Analytical Chemistry*, 70 (7), 814-818.
- Narduzzi L., Stanstrup J., Mattivi F., 2015. Comparing wild American grapes with *Vitis vinifera*: a metabolomics study of grape composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (30), 6823-6834.
- Nicolas S. D., Péros J. P., Lacombe T., Launay A., Le Paslier M. C., Bérard A., Mangin B., Valière S., Martins F., Le Cunff L., Laucou V., Bacilieri R., Dereeper A., Chatelet P., This P., Doligez A., 2016. Genetic

- diversity, linkage disequilibrium and power of a large grapevine (*Vitis vinifera* L) diversity panel newly designed for association studies. *BMC Plant Biology*, 16, 74.
- Oliva M., Bar E., Ovadia R., Perl A., Galili G., Lewinsohn E., Oren-Shamir M., 2017. Phenylpyruvate Contributes to the Synthesis of Fragrant Benzenoid–Phenylpropanoids in *Petunia × hybrida* Flowers. *Frontiers in Plant Science*, 8, 769.
- Olmo H. P., 1986. The potential role of (*vinifera* x *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 42 (8), 921-926.
- Pap D., Riaz S., Dry I. B., Jermakow A., Tenschler A. C., Cantu D., Oláh R., Walker M. A., 2016. Identification of two novel powdery mildew resistance loci, *Ren6* and *Ren7*, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biology*, 16, 170.
- Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A.-F., 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 1201-1210.
- Pawlus A. D., Sahli R., Bisson J., Rivière C., Delaunay J. C., Richard T., Gomès E., Bordenave L., Wafflo-Tégou P., Mérillon J. M., 2013. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (3), 501-511.
- Pawlus A. D., Wafflo-Tégou P., Shaver J., Merillon J. M., 2012. Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 46 (2), 57-111.
- Riaz S., Tenschler A.C., Ramming D.W., Walker M.A., 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 122 (6), 1059-1073.
- Ruel J. J., Walker M. A., 2006. Resistance to Pierce's disease in *Muscadinia rotundifolia* and other native grape species. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (2), 158-165.
- Sandhu A. K., Gu L., 2010. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (8), 4681-4692.
- Schmidlin L., Poutaraud A., Claudel P., Mestre P., Prado E., Santos-Rosa M., Wiedemann-Merdinoglu S., Karst F., Merdinoglu D., Huguene P., 2008. A Stress-Inducible Resveratrol O-Methyltransferases Involved in the Biosynthesis of Pterostilbene in Grapevine. *Plant Physiology*, 148, 1630–1639
- Schneider V., 2014. Atypical aging defect: sensory discrimination, viticultural causes, and enological consequences. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65 (3), 277-284.
- Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R., 2012. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (1), 163-176.
- Sefton M. A., 1998. Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice sample of *Vitis vinifera* grape cvs Merlot and Cabernet Sauvignon. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4 (1), 30-38.
- Sefton M. A., Francis I. L., Williams P. J., 1993. The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavor precursor analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44 (4), 359-370.
- Sefton M. A., Francis I. L., Williams P. J., 1994. Free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* Grape cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Food Science*, 59 (1), 142-147.

- Sengupta S., Majumder A. L., 2010. *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a wild rice: a potential model for studying salt-stress biology in rice. *Plant, Cell & Environment*, 33 (4), 526-542.
- Shalit M., Katzir N., Tadmor Y., Larkov O., Burger Y., Shalekhet F., Lastochkin E., Ravid U., Amar O., Edelstein M., Karchi Z., Lewinsohn E., 2001. Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 794-799.
- Shimizu T., Kojima M., 1984. Partial purification and characterization of UDPG: *t*-cinnamate glucosyltransferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. *The Journal of Biochemistry*, 95 (1), 205-212.
- Talcott S. T., Lee J. H., 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (11), 3186-3192.
- Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Coste P., Dumas V., Butterlin G., Bouquet A., Merdinoglu D., 2006. Genetic analysis of resistance to downy mildew from *Muscadinia rotundifolia*. 9th International Conference on Grape genetics and Breeding, Udine, Italie.
- Wittstock U., Halkier B. A., 2000. Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (19), 14659-14666.
- Yamaguchi T., Yamamoto K., Asano Y., 2014. Identification and characterization of CYP79D16 and CYP71AN24 catalyzing the first and second steps in L-phenylalanine-derived cyanogenic glycoside biosynthesis in the Japanese apricot, *Prunus mume* Sieb. et Zucc. *Plant Molecular Biology*, 86 (1-2), 215.
- Zhu L., Zhang Y., Lu J., 2012. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (3), 3492-3510.

3. Analyses additionnelles

En plus de l'étude des composés volatiles spécifiques de *M. rotundifolia* dans les baies, les composés non volatiles ont été analysés. Les résultats de ces travaux n'ayant conduit à aucune identification ou analyse du déterminisme génétique, ils n'ont pas pu être intégrés à l'article présenté précédemment. Néanmoins, certaines caractéristiques des composés non volatiles spécifiques de *M. rotundifolia* ont pu être révélées.

L'extraction des métabolites non volatiles des baies a été réalisée en même temps que celle des composés volatiles, sur les mêmes échantillons. L'analyse des extraits a été effectuée de la même façon que pour les extraits de feuilles, c'est-à-dire en chromatographie liquide, avec ionisation en mode positif et en mode négatif, puis détection par spectrométrie de masse. Les mêmes seuils que pour les métabolites détectés sur feuille et baies ont été utilisés. Ainsi, un ion était considéré comme très spécifique si l'aire du pic maximale mesurée dans les échantillons de *V. vinifera* était 100 fois inférieure à l'aire du pic minimale mesurée dans les échantillons de *M. rotundifolia*. Un ion était considéré comme partiellement spécifique si l'aire du pic maximale mesurée dans les échantillons de *V. vinifera* était inférieure à 10^5 et 10 fois inférieure à l'aire du pic minimale mesurée dans les échantillons de *M. rotundifolia*.

La comparaison des aires mesurées chez *V. vinifera* et *M. rotundifolia* a permis de détecter 83 ions très spécifiques, 49 en mode positif et 34 en mode négatif, et 49 ions partiellement spécifiques, 26 en mode positif et 23 en mode négatif (Tableau V.1). Étant données la complexité des spectres chromatographiques des baies (beaucoup de composés sont glycosylés et se fragmentent en cascade) et la grande quantité d'ions détectés comme spécifiques, leur identification n'a pas pu être réalisée sur leur ensemble. Cependant, quelques ions ont pu être identifiés de façon certaine, tels que la myricetin-rhamnoside, M319T224 en positif (fragment) et M463T224 en négatif, déjà identifiée dans les feuilles comme spécifique. De plus, la formule brute des ions M303T124 et M303T232 correspond à celle du fragment acide ellagique. Ces ions pourraient être issus de dérivés d'acides ellagique et appartenir à la famille des ellagitannins.

Tableau V.1. Métabolites non volatiles des baies spécifiques de *M. rotundifolia*

Ions	TR ^a	Masse (g/mol)	Formule chimique ^b	Adduit détecté proposé	Aire normalisée du pic (x10 ⁶)		Sp. ^c
					<i>V. vinifera</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
Mode positif							
M633T102	1,70	633,07269	C27 H21 O18	[M+H] ⁺	nd ^d	0,07 – 0,65	**
M485T103	1,72	485,09299	C20 H21 O14	[M+H] ⁺	nd	0,12 – 0,38	**
M651T103	1,73	651,08301	C27 H23 O19	[M+H] ⁺	nd	0,23 – 0,73	**
M437T105	1,75	437,07176	C19 H17 O12	[M+H] ⁺	nd	0,83 – 2,52	**
M667T107	1,78	667,07806	C27 H23 O20	[M+H] ⁺	nd	0,07 – 1,12	**
M501T114	1,90	501,26971	C25 H41 O10	[M-2H2O+H] ⁺	nd – 0,04	0,57 – 1,74	*
M876T116	1,93	876,31934	C44 H50 O16 N3	[M+H] ⁺	nd	0,26 – 0,80	**
M303T124	2,06	303,01349	C14 H7 O8	[M-C6H10O5+H] ⁺	nd – 0,02	1,08 – 3,93	*
M393T124	2,06	393,07925	-	[M+H] ⁺	nd – 0,01	0,27 – 0,54	*
M416T124	2,06	416,15512	C18 H26 O10 N	[M+H] ⁺	nd	0,22 – 0,48	*
M667T124	2,06	667,07800	C27 H23 O20	[M+H] ⁺	nd	0,03 – 0,50	**
M679T124	2,06	679,11365	C29 H27 O19	[M+H] ⁺	nd – 0,01	0,12 – 0,56	*
M277T132	2,20	277,03433	C13 H9 O7	[M+H] ⁺	nd	0,41 – 1,14	**
M447T132	2,20	447,05594	C20 H15 O12	[M+H] ⁺	nd – 0,03	1,15 – 3,87	*
M818T132	2,20	818,10455	C34 H28 O23 N	[M+NH4] ⁺	nd	1,19 – 3,41	**
M277T144	2,43	277,03421	C13 H9 O7	[M+H] ⁺	nd	0,38 – 1,00	**
M846T145	2,43	846,13580	C36 H32 O23 N	[M+NH4] ⁺	nd	0,29 – 0,82	**
M976T144	2,43	976,12604	C40 H32 O27 N	[M+NH4] ⁺	nd	0,47 – 1,32	**
M679T150	2,50	679,11371	C29 H27 O19	[M+H] ⁺	nd – 0,04	0,44 – 1,50	*
M991T155	2,57	991,08856	C40 H31 O30	[M+H] ⁺	nd – 0,01	2,17 – 6,39	**
M293T157	2,61	293,02893	C13 H9 O8	[M+H] ⁺	nd – 0,05	2,67 – 10,01	*

Ions	TR ^a	Masse (g/mol)	Formule chimique ^b	Adduit détecté proposé	Aire normalisée du pic (x10 ⁶)		Sp. ^c
					<i>V. vinifera</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
M428T157	2,61	427,99359	-	[M+H] ⁺	nd	0,28 – 0,79	**
M975T164	2,74	975,09399	C40 H31 O29	[M+H] ⁺	nd	0,05 – 0,19	**
M570T171	2,82	570,02008	C30 H8 O10 N3	[M+H] ⁺	nd – 0,01	0,51 – 0,94	*
M355T178	2,93	355,02942	C14 H11 O11	[M+H] ⁺	nd	0,81 – 2,56	**
M851T178	2,93	851,07721	C34 H27 O26	[M+H] ⁺	nd	0,51 – 2,02	**
M874T178	2,93	874,09393	C36 H28 O25 N	[M+H] ⁺	nd – 0,04	1,61 – 4,79	*
M968T177	2,93	968,03174	-	[M+H] ⁺	nd	0,38 – 0,75	**
M447T184	3,05	447,05591	C20 H15 O12	[M+H] ⁺	nd – 0,03	0,81 – 3,30	*
M846T184	3,06	846,13593	C36 H32 O23 N	[M+NH4] ⁺	nd – 0,02	0,41 – 2,06	*
M847T184	3,06	847,11829	-	[M+H] ⁺	nd	0,37 – 1,43	**
M584T185	3,07	584,03619	-	[M+H] ⁺	nd – 0,01	0,17 – 0,40	*
M819T197	3,28	819,08844	C34 H27 O24	[M+H] ⁺	nd	0,56 – 2,56	**
M957T198	3,29	957,08374	C40 H29 O28	[M-H2O+H] ⁺	nd	0,25 – 0,68	**
M1032T204	3,40	1032,11597	-	[M+H] ⁺	nd	0,40 – 3,69	**
M991T204	3,40	991,08936	C40 H31 O30	[M+H] ⁺	nd	1,76 – 15,18	**
M136T215	3,59	136,07570	C8 H10 O N	[M+H] ⁺	nd – 0,03	0,79 – 15,70	*
M277T216	3,60	277,03418	C13 H9 O7	[M+H] ⁺	nd	0,20 – 0,64	**
M447T215	3,60	447,05566	C20 H15 O12	[M+H] ⁺	nd – 0,01	0,80 – 2,11	*
M679T216	3,60	679,11383	C29 H27 O19	[M+H] ⁺	nd – 0,02	0,38 – 1,45	*
M801T215	3,60	801,07758	C34 H25 O23	[M+H] ⁺	nd	0,29 – 0,82	**
M846T215	3,60	846,13574	C36 H32 O23 N	[M+NH4] ⁺	nd – 0,01	0,71 – 1,83	**
M129T224	3,73	129,05484	C6 H9 O3	[M+H] ⁺	nd – 0,07	1,46 – 4,10	*
M319T224	3,73	319,04493	C15 H11 O8	[M-C6H10O4+H] ⁺	nd – 1,14	139,96 – 331,54	**
M943T225	3,73	943,17777	C42 H39 O25	[M+H] ⁺	nd	1,02 – 3,02	**
M499T225	3,75	499,10867	C21 H23 O14	[M+H] ⁺	nd	0,09 – 0,39	**
M303T232	3,85	303,01358	C14 H7 O8	[M+H] ⁺	nd	1,54 – 10,92	**
M438T231	3,85	437,97827	-	[M+H] ⁺	nd – 0,01	1,28 – 3,79	*
M161T237	3,96	161,11722	C8 H17 O3	[M+H] ⁺	nd	0,29 – 1,64	**
M886T239	4,04	886,13055	C38 H32 O24 N	[M+H] ⁺	nd	0,64 – 1,78	**
M347T248	4,13	347,03970	C16 H11 O9	[M-2H2O+H] ⁺	nd	1,08 – 3,81	**
M879T248	4,13	879,10907	C36 H31 O26	[M+H] ⁺	nd	0,44 – 1,96	**
M902T248	4,13	902,12524	C38 H32 O25 N	[M+H] ⁺	nd – 0,01	1,01 – 3,00	**
M996T248	4,13	996,06305	C59 H18 O16 N	[M+H] ⁺	nd	0,60 – 1,01	**
M433T264	4,40	433,20431	-	[M+H] ⁺	nd – 0,09	0,98 – 3,01	*
M155T275	4,59	155,14301	C10 H19 O	[M-H2O+H] ⁺	nd – 0,01	0,71 – 6,74	**
M902T282	4,69	902,12561	C38 H32 O25 N	[M+H] ⁺	nd	0,53 – 1,46	**
M856T282	4,70	856,08386	C36 H26 O24 N	[M+H] ⁺	nd	0,22 – 0,82	**
M878T294	4,90	878,12537	C49 H24 O14 N3	[M+H] ⁺	nd	0,17 – 1,41	**
M873T333	5,55	873,13525	C38 H33 O24	[M+H] ⁺	nd	0,10 – 0,50	**
M188T370	6,18	188,09178	C8 H14 O4 N	[M+H] ⁺	nd – 0,02	0,39 – 1,69	*
M454T372	6,21	454,26468	C20 H40 O10 N	[M+NH4] ⁺	nd – 0,02	0,47 – 2,24	*
M878T385	6,43	878,12537	C36 H32 O25 N	[M+H] ⁺	nd	0,23 – 1,80	**
M240T389	6,48	240,06895	-	[M+H] ⁺	nd	0,16 – 1,32	**
M440T410	6,85	439,25364	C20 H39 O10	[M+H] ⁺	nd – 0,02	1,79 – 13,26	*
M461T411	6,85	461,23559	-	[M+H] ⁺	nd – 0,03	0,29 – 1,28	*
M480T414	6,92	480,28049	C22 H42 O10 N	[M+NH4] ⁺	nd – 0,04	7,21 – 23,16	**
M485T415	6,92	485,23593	-	[M+H] ⁺	nd – 0,03	0,72 – 1,59	*
M925T415	6,92	925,50055	C44 H77 O20	[M+H] ⁺	nd	0,12 – 0,95	**
M188T436	7,26	188,09169	C8 H14 O4 N	[M+NH4] ⁺	nd – 0,03	2,48 – 9,13	*
M293T436	7,26	293,12300	C12 H21 O8	[M+H] ⁺	nd	1,68 – 17,32	**
M482T436	7,26	482,29572	C22 H44 O10 N	[M+NH4] ⁺	nd – 0,08	7,90 – 26,74	**
M487T436	7,26	487,25122	-	[M+H] ⁺	nd – 0,03	1,33 – 3,60	*
M930T436	7,26	929,53108	C44 H81 O20	[M+H] ⁺	nd	0,29 – 3,31	**
M951T436	7,26	951,51305	-	[M+H] ⁺	nd	0,20 – 0,77	**
Mode négatif							
M513T80	1,37	513,05237	C20 H17 O16	[M-H] ⁻	nd	0,17 – 0,95	*
M649T83	1,37	649,06885	C27 H21 O19	[M-H] ⁻	nd – 0,02	0,27 – 1,04	*
M631T106	1,70	631,05823	C27 H19 O18	[M-H] ⁻	nd	0,32 – 1,82	*
M649T102	1,70	649,06873	C27 H21 O19	[M-H] ⁻	nd – 0,03	0,47 – 2,06	*

Ions	TR ^a	Masse (g/mol)	Formule chimique ^b	Adduit détecté proposé	Aire normalisée du pic (x10 ⁶)		Sp. ^c
					<i>V. vinifera</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
M453T102	1,71	453,06766	C19 H17 O13	[M-H] ⁻	nd - 0,03	3,76 - 15,84	**
M469T102	1,72	469,06250	C19 H17 O14	[M-H] ⁻	nd	0,36 - 1,13	**
M665T108	1,78	665,06390	C27 H21 O20	[M-H] ⁻	nd	0,26 - 2,52	**
M369T123	2,06	369,08276	C16 H17 O10	[M-H] ⁻	nd - 0,10	2,15 - 3,90	*
M463T122	2,06	463,05209	C20 H15 O13	[M-H] ⁻	nd - 0,09	6,24 - 17,40	**
M667T126	2,06	665,06372	C27 H21 O20	[M-H] ⁻	nd	3,28 - 34,74	**
M678T126	2,06	677,09998	C29 H25 O19	[M-H] ⁻	nd - 0,04	0,55 - 1,74	*
M799T131	2,20	799,06427	C34 H23 O23	[M-H] ⁻	nd - 0,04	5,29 - 15,9	**
M574T135	2,22	574,17798	C24 H32 O15 N	[M-H] ⁻	nd	0,11 - 1,12	**
M827T146	2,43	827,09570	C36 H27 O23	[M-H] ⁻	nd - 0,01	2,29 - 8,42	**
M957T144	2,43	957,08600	C40 H29 O28	[M-H] ⁻	nd - 0,05	1,96 - 8,84	*
M677T151	2,50	677,10004	C29 H25 O19	[M-H] ⁻	nd - 0,09	1,85 - 7,03	*
M292T156	2,61	291,01474	C13 H7 O8	[M-H] ⁻	nd - 0,08	4,20 - 14,12	*
M989T155	2,61	989,07562	C40 H29 O30	[M-H] ⁻	nd - 0,01	4,99 - 18,45	**
M973T165	2,74	973,08118	C40 H29 O29	[M-H] ⁻	nd	0,23 - 0,85	**
M831T177	2,96	831,05396	C34 H23 O25	[M-H] ⁻	nd - 0,09	18,46 - 63,82	**
M989T182	3,04	989,07544	C40 H29 O30	[M-H] ⁻	nd	1,22 - 4,09	**
M896T185	3,07	895,12164	C40 H31 O24	[M-H] ⁻	nd	0,58 - 4,89	**
M877T188	3,13	877,24023	C40 H45 O22	[M-H] ⁻	nd	0,07 - 0,74	**
M1198T195	3,25	1198,18066	-	[M-H] ⁻	nd	0,39 - 1,72	**
M818T196	3,28	817,07501	C34 H25 O24	[M-H] ⁻	nd - 0,01	2,13 - 14,51	**
M973T197	3,29	973,08014	C40 H29 O29	[M-H] ⁻	nd	0,07 - 0,27	**
M1001T197	3,30	1001,11163	C42 H33 O29	[M-H] ⁻	nd	0,40 - 1,26	**
M376T197	3,30	376,02548	C33 H20 O21	[M-H] ⁻	nd	0,36 - 1,44	**
M827T199	3,31	827,09564	C36 H27 O23	[M-H] ⁻	nd - 0,01	1,04 - 3,64	*
M441T209	3,48	441,17661	C21 H29 O10	[M-H] ⁻	nd - 0,02	4,65 - 13,09	**
M677T216	3,60	677,10004	C29 H25 O19	[M-H] ⁻	nd - 0,04	0,91 - 3,03	*
M827T216	3,60	827,09570	C36 H27 O23	[M-H] ⁻	nd - 0,06	4,27 - 12,24	*
M463T224	3,73	463,08802	C21 H19 O12	[M-H] ⁻	nd	129,76 - 246,52	**
M497T226	3,75	497,09381	C21 H21 O14	[M-H] ⁻	nd - 0,02	1,04 - 1,92	*
M843T241	4,04	843,08533	C36 H27 O24	[M-H] ⁻	nd - 0,02	3,64 - 13,15	**
M859T248	4,13	859,08514	C36 H27 O25	[M-H] ⁻	nd - 0,15	28,55 - 104,2	**
M895T249	4,13	895,06097	-	[M-H] ⁻	nd	0,27 - 0,49	**
M142T257	4,28	142,06535	-	[M-H] ⁻	nd	0,28 - 2,28	**
M174T258	4,28	174,05540	C10 H8 O2 N	[M-H] ⁻	nd	0,10 - 0,89	*
M204T258	4,28	204,06613	C11 H10 O3 N	[M-H] ⁻	nd	0,29 - 2,55	*
M526T270	4,50	525,25537	C23 H41 O13	[M+CH2O2-H] ⁻	nd - 0,05	1,40 - 12,98	*
M895T283	4,70	895,06146	-	[M-H] ⁻	nd	0,29 - 0,90	**
M872T333	5,55	871,12164	C38 H31 O24	[M-H] ⁻	nd - 0,04	5,06 - 33,77	**
M415T350	5,84	415,16138	C19 H27 O10	[M+CH2O2-H] ⁻	nd - 0,01	0,41 - 1,38	*
M481T373	6,21	481,22922	C21 H37 O12	[M+CH2O2-H] ⁻	nd - 0,05	1,66 - 7,77	*
M238T389	6,48	238,05420	-	[M-H] ⁻	nd	0,07 - 0,56	**
M137T397	6,62	137,02357	-	[M-H] ⁻	nd - 0,02	0,21 - 3,20	*
M505T398	6,92	461,23950	C22 H37 O10	[M-H] ⁻	nd	0,19 - 0,69	**
M701T412	6,85	701,37573	-	[M-H] ⁻	nd - 0,01	0,12 - 0,62	*
M497T415	6,92	497,21606	-	[M-H] ⁻	nd - 0,02	1,10 - 3,42	*
M499T415	6,92	499,21280	C31 H31 O6	[M-H] ⁻	nd	0,33 - 1,01	**
M507T414	6,92	507,24442	C23 H39 O12	[M+CH2O2-H] ⁻	nd - 0,06	13,19 - 57,76	**
M499T436	7,25	499,23181	-	[M-H] ⁻	nd - 0,02	1,69 - 5,02	**
M501T436	7,25	501,22842	C31 H33 O6	[M-H] ⁻	nd	0,49 - 1,51	**
M509T436	7,25	509,25998	C23 H41 O12	[M+CH2O2-H] ⁻	nd - 0,21	23,52 - 122,75	**
M973T435	7,25	973,52344	C45 H81 O22	[M+CH2O2-H] ⁻	nd	0,06 - 0,69	**
M305T438	7,31	305,07007	-	[M-H] ⁻	nd - 0,01	0,34 - 1,44	*

^a TR = Temps de rétention (min) ; ^b La formule chimique a été établie à partir de la masse moléculaire ; ^c Spécificité (** = très spécifique, * = partiellement spécifique); ^d nd = Non détecté.

4. Conclusion

La comparaison de plusieurs accessions de *V. vinifera* et *M. rotundifolia* a été réalisée grâce à une chromatographie gazeuse (GC) sur les baies pour déterminer la présence des composés volatiles libres ou glycosylés, et à une chromatographie liquide (LC) sur les feuilles et sur les baies pour déterminer la présence des composés non volatiles. Ces deux techniques, couplées à un spectromètre de masse ont permis la détection d'ions et l'identification des métabolites dont ils étaient issus. Néanmoins, étant donnée l'abondance de composés non volatiles dans les feuilles et dans les baies, l'identification des ions détectés en LC s'est avérée difficile. La comparaison des deux espèces a conduit à la détection, dans les feuilles, de 26 ions spécifiques de *M. rotundifolia* et, dans les baies, de 23 composés volatiles libres, 19 précurseurs de composés volatiles glycosylés et 83 ions spécifiques de *M. rotundifolia*. Les analyses nous permettent de supposer que, parmi les métabolites non volatiles, beaucoup appartiennent à la famille des ellagitannins, que ce soit dans la feuille ou dans la baie. De plus, une grande majorité des composés volatiles et de leurs précurseurs est produite par la voie métabolique dérivée de la phénylalanine.

L'analyse du déterminisme génétique des ions spécifiques de *M. rotundifolia* dans les feuilles a montré une ségrégation particulière de l'abondance relative des ions dans plusieurs populations de backcross. Ainsi, le contrôle génétique de ces ions est effectué par deux types de composantes : des composantes qualitatives et des composantes quantitatives. Les composantes qualitatives exercent un contrôle sur l'absence ou la présence des ions dans les feuilles de l'individu alors que les composantes quantitatives contrôlent la concentration de l'ion, lorsque celui-ci est présent. Seules quelques régions du génome paraissent être impliquées dans le contrôle génétique des 26 ions spécifiques de *M. rotundifolia* identifiés dans les feuilles. Ainsi, seuls les chromosomes 6, 11 et 18 sont porteurs de facteurs qualitatifs. Au cours de l'introggression des facteurs de résistance de *M. rotundifolia* chez *V. vinifera*, l'élimination des facteurs qualitatifs est le point charnière de l'élimination des composés spécifiques de *M. rotundifolia*. Ici, cette élimination semble être relativement aisée étant donné le regroupement de tous les facteurs qualitatifs dans quelques régions. Cependant, une grande partie de ces facteurs est localisée près des facteurs de résistance *Rpv2* et *Run2*. Leur élimination risque donc d'être délicate.

Chapitre VI : Conclusion générale et perspectives

VI. Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion

L'objectif double de cette thèse était, d'une part, de déterminer les causes, sur les plans génétique et génomique, rendant les croisements entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera* difficiles et, d'autre part, d'identifier et d'établir le déterminisme génétique des caractères phénotypiques spécifiques à *M. rotundifolia*, qu'ils soient impliqués ou non dans les défauts culturaux et organoleptiques de la muscadine. Plusieurs résultats marquants pouvant avoir une implication directe ou indirecte dans le processus de sélection ont été obtenus.

Des régions impliquées dans la survie ou la mortalité des individus hybrides F1 et issus de backcross ont été identifiées grâce à l'étude de cartes génétiques à haute densité de marqueurs, générées à l'aide de données SNP issues du GBS. Ainsi, nous avons pu constater que certaines régions provenant de *M. rotundifolia* peuvent avoir un effet favorable ou défavorable sur la survie des plantes. Cet effet peut être observé sur plusieurs croisements, impliquant des accessions de *M. rotundifolia* différentes, ou sur un seul croisement. Par exemple, l'effet délétère du chromosome 11 a été observé dans plusieurs populations dérivées de deux accessions de *M. rotundifolia*, Trayshed et NC184-4. À l'inverse, l'effet du chromosome 13 n'a été observé que dans la population de BC1 dérivée de *M. rotundifolia* cv. Trayshed. L'élimination préférentielle de régions chromosomiques issues de *M. rotundifolia* dans les backcross n'est pas surprenante étant donnée la proportion plus importante de génome de *V. vinifera*, ce qui peut induire des interactions entre allèles des deux espèces en faveur de *V. vinifera*. En revanche, la conservation de régions issues de *M. rotundifolia* est plus étonnante, en particulier lorsque cela se produit de façon identique dans plusieurs croisements impliquant des sources de *M. rotundifolia* et de *V. vinifera* différentes, comme c'est le cas pour le chromosome 1. Une explication de ce phénomène est la présence d'allèles de *M. rotundifolia* augmentant les chances de succès des gamètes dans lesquels ils sont (Rieseberg *et al.*, 2000). En réduisant le nombre d'individus atteignant la maturité, les régions à l'origine de biais de ségrégation ont un impact non négligeable sur la diversité génétique disponible au sein des populations. La conservation des caractères de résistance, ou de tout autre caractère d'intérêt issu de *M. rotundifolia*, est plus difficile si ce dernier est situé dans une région préférentiellement éliminée. De même, l'élimination d'un caractère indésirable de *M. rotundifolia* peut être entravée si le facteur contrôlant ce caractère est situé dans une région préférentiellement gardée.

Une différence notable de l'évolution des taux de recombinaison le long des chromosomes dans la population de BC1 et dans les populations de niveaux de backcross plus avancés a été mise en évidence grâce à l'étude des taux de recombinaison des cartes génétiques des populations. Cette différence de distribution des recombinaisons a été attribuée au degré d'homologie des paires de chromosomes : les paires de chromosomes entièrement homologues ou entièrement homéologues ont des taux de recombinaison similaires à ceux de *V. vinifera* alors que les paires de chromosomes avec à la fois des régions homologues et des régions homéologues ont des taux de recombinaison faibles, voire nuls, dans les régions homéologues et très élevés dans les régions homologues. Le niveau élevé de synténie entre les génomes de *V. vinifera* et *M. rotundifolia*, observé par Blanc *et al.* (2012), a été confirmé par la bonne colinéarité des cartes des parents hybrides par rapport à celles des parents *V. vinifera*. La répartition singulière des recombinaisons le long du chromosome ne peut donc pas être expliquée par des réarrangements chromosomiques entre les deux espèces ou par des inversions mais plutôt par de fortes différences dans la séquence génétique. Cette hypothèse est étayée par des études antérieures prouvant que divers mécanismes limitent les recombinaisons dans les régions homéologues pendant la méiose (Hunter *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2006). Le phénomène de

suppression/augmentation des recombinaisons dans les régions homéologues/homologues est probablement le résultat de trois contraintes : la nécessité de recombiner pour assurer une méiose produisant des gamètes viables tout en limitant les risques de perdre des haplotypes favorables, la possibilité de s'apparier de façon optimale entre les deux chromosomes, et la capacité de la région à se réparer (Kauppi *et al.*, 2004).

La comparaison de plusieurs accessions de *M. rotundifolia* et de *V. vinifera* a permis l'identification de 31 caractères phénologiques et morphologiques spécifiques de *M. rotundifolia*, ainsi que la détection, dans les feuilles, de 26 ions spécifiques de *M. rotundifolia* et, dans les baies, de 23 composés volatiles libres, 19 composés volatiles glycosylés et 83 ions spécifiques de *M. rotundifolia*. Lors de cette étude, des caractères connus pour différencier *M. rotundifolia* de *V. vinifera* ont été confirmés comme spécifiques de *M. rotundifolia* (ramification des vrilles, lenticelles sur le bois notamment). Certains caractères, au contraire, ont été infirmés, tels que l'organisation du bourgeon latent et la densité du bois. La grande diversité d'accessions de *V. vinifera* étudiées a permis d'identifier des variétés avec des caractéristiques communément attribuées à *M. rotundifolia* (plans d'organisation des bourgeons primaires et secondaires parallèles et densité du bois supérieure à 1). Ces caractères ne peuvent donc pas être utilisés comme marqueurs de *M. rotundifolia* dans les variétés de vigne cultivées issues de croisements interspécifiques. En outre, certaines caractéristiques de *M. rotundifolia* peuvent présenter un intérêt pour la sélection. En effet, la tardivité de floraison et de véraison et la tolérance aux températures élevées de *M. rotundifolia* sont des qualités recherchées pour la création de variétés de vigne tardives adaptées au changement climatique. Par ailleurs, tous les composés volatiles libres et glycosylés, détectés comme spécifiques de *M. rotundifolia* dans les baies, ont pu être identifiés, à l'exception d'un composé. Une partie d'entre eux sont des composés phénoliques appartenant à la même voie de biosynthèse et dérivant de la phénylalanine. Dans les feuilles, l'identification des métabolites non volatiles est plus délicate. En s'appuyant sur leur masse moléculaire, leur spectre de masse et les propriétés connues de *M. rotundifolia*, quelques ions ont pu être identifiés comme appartenant probablement à la famille des ellagitanins, une famille très étendue chez les vignes américaines et peu présente, voire absente, chez *V. vinifera* (Narduzzi *et al.*, 2015). La présence de tels composés ou de tout autre caractère spécifique de *M. rotundifolia* risque de limiter fortement le développement des variétés créées à partir de croisement interspécifiques entre *M. rotundifolia* et *V. vinifera* en raison de la mauvaise image des hybrides. La détermination du contrôle génétique de ces caractères est donc primordiale pour faciliter leur élimination au cours des croisements.

L'analyse du déterminisme génétique des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* a montré un contrôle différent entre les caractères phénologiques et morphologiques, d'une part, et les métabolites secondaires, d'autre part. Ainsi, le contrôle génétique des caractères phénologiques et morphologiques est basé sur de nombreux QTL à faible effet et parfois un ou deux QTL à fort effet, détectés à la fois chez *V. vinifera*, dans les régions homologues ou dans les régions homéologues des hybrides interspécifiques. Ces QTL sont peu stables d'un environnement à l'autre et surtout d'une population à l'autre, d'une source de muscadine à l'autre. La liste des QTL détectés dans cette étude n'est donc pas exhaustive mais fournit une base de travail et de précieuses informations sur les régions chromosomiques préférentiellement impliquées dans le contrôle des caractères morphologiques et phénologiques spécifiques de *M. rotundifolia*. Contrairement aux caractères morphologiques et phénologiques, le contrôle génétique des métabolites secondaires des feuilles est fondé sur un facteur qualitatif de type absence/présence, généralement localisé dans une région homéologue, et un ou plusieurs facteurs quantitatifs, d'origines diverses. Tous ces facteurs, et en particulier les facteurs qualitatifs, sont très stables d'un environnement à l'autre, d'une population à l'autre et d'une source de muscadine à l'autre. De plus, ils sont regroupés sur peu de chromosomes. Ainsi, les chromosomes 6, 11 et 18 portent l'ensemble des facteurs qualitatifs détectés dans les régions homéologues et

contrôlant la présence de 24 ions spécifiques de *M. rotundifolia*. Le regroupement de tous les facteurs, qualitatifs et quantitatifs, sur des portions restreintes du génome est particulièrement intéressant pour gérer leur élimination lors des backcross.

Dans le cadre de la création de variétés de vignes résistantes aux maladies, il est nécessaire d'avoir des recombinaisons entre les facteurs contrôlant des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* et les facteurs de résistance, lorsque ceux-ci sont situés sur le même chromosome. Peu de facteurs contrôlant des caractères phénologiques et morphologiques ont été identifiés à proximité de facteurs de résistance connus. Des QTL contrôlant la somme de température entre débourrement et floraison, la distribution de la pigmentation anthocyanique sur les nervures de la face inférieure du limbe de la feuille, l'aire du limbe et l'adhérence de la peau à la pulpe ont été détectés à proximité du locus *Rpv1/Run1*. Cependant, étant donnée l'étendue de l'intervalle de confiance de ces QTL, la probabilité d'avoir une recombinaison entre les deux régions est non nulle et l'élimination de ces caractères spécifiques indésirables est possible. En revanche, un QTL contrôlant l'aire du limbe a été détecté sur le chromosome 18, dans la région des facteurs de résistance *Rpv2* et *Run2*. La séparation de ces facteurs grâce à une recombinaison est peu probable. Néanmoins, la combinaison, chez un individu, de ce QTL avec d'autres QTL contrôlant ce caractère mais avec un effet inverse peut réduire l'expression de ce caractère indésirable. De nombreux facteurs contrôlant la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires des feuilles ont également été détectés à proximité des facteurs *Rpv2* et *Run2*. Dans le cas des facteurs qualitatifs, il est impossible de compenser leur effet par un autre facteur. Il est donc primordial de les éliminer lors du processus d'introgession.

Ces résultats laissent entrevoir des améliorations dans le processus de sélection et fournissent les connaissances et les outils nécessaires à l'introgession de facteurs de résistance issus de *M. rotundifolia* chez *V. vinifera*. La méiose de l'hybride F1 étant la seule à présenter des recombinaisons interspécifiques en raison de l'homéologie complète des paires de chromosomes, il est important d'éliminer dès le BC1 les facteurs génétiques localisés près des facteurs de résistance et impliqués dans le contrôle de caractères défavorables. Par la suite, l'élimination de tels facteurs, tout en conservant les gènes de résistance, risque d'être beaucoup plus difficile, voire impossible.

2. Perspectives

Les résultats de cette thèse s'inscrivent à la fois dans un cadre théorique, i.e. apporter des connaissances sur *M. rotundifolia* et sur les croisements interspécifiques avec *V. vinifera*, et dans un cadre pratique, i.e. mettre en valeur ces connaissances dans le processus de création de variétés de vigne résistantes au mildiou et à l'oïdium.

a. Perspectives scientifiques

i. Comprendre l'impact des régions chromosomiques sur la survie ou la mortalité des hybrides

L'étude de la ségrégation des allèles de *M. rotundifolia* dans les populations de backcross a mis en évidence que, dans certaines régions, l'allèle de *M. rotundifolia* est préférentiellement conservé alors que, dans d'autres régions, il est préférentiellement éliminé. De telles régions peuvent avoir le même effet dans plusieurs populations issues de croisements avec des accessions de *M. rotundifolia* différentes. En outre, leur effet peut se manifester à différents stades de développement. Il apparaît donc que des mécanismes variés sont à l'origine de ces biais de ségrégation. Comme discuté précédemment, les régions responsables de forts biais de ségrégation, quelle que soit l'accession de *M. rotundifolia* utilisée, peuvent fortement entraver la sélection. Il est donc nécessaire de connaître plus précisément les mécanismes à l'origine de ces biais afin de mettre au point des méthodes, comme le sauvetage d'embryon, pour faciliter la réussite des croisements ou la survie des backcross. Par

ailleurs, il est également intéressant de comprendre l'origine des biais spécifiques à certains croisements afin de choisir les géniteurs les plus adaptés et d'éviter les interactions alléliques négatives entre les parents hybrides et *V. vinifera* d'une génération, d'une part, et entre les parents *V. vinifera* de plusieurs générations successives, d'autre part.

La gestion des biais de ségrégation est très importante, notamment pour la détection de QTL. En effet, la taille des populations étudiées influence fortement la précision de la détection. Plus une population sera grande, plus la densité de marqueurs que l'on pourra cartographier sera élevée. Dans cette étude, trois populations de tailles différentes ont été étudiées : une population de BC1 de 68 individus, une population de BC2 de 248 individus et une population de BC4 de 79 individus. La population de BC2 étant plus grande que celles de BC1 et de BC4, plus de marqueurs ont pu être cartographiés à des positions uniques. Cependant, étant données les fortes variations du taux de recombinaison, la précision de détection des QTL sur les cartes génétiques de cette population varie en fonction des chromosomes étudiés. Sur les paires de chromosomes entièrement homologues ou entièrement homéologues, la précision de détection est meilleure que sur les paires de chromosomes avec à la fois des régions homologues et des régions homéologues. Pour éviter cette perte de précision, la détection de QTL doit être réalisée sur la population de BC1, les taux de recombinaison étant similaires à ceux d'un croisement intraspécifique. Il est donc important d'obtenir en BC1 des populations de taille suffisante pour permettre une étude génétique précise de la population.

ii. Caractères phénotypiques complexes

La majorité des caractères et métabolites secondaires identifiés comme spécifiques *M. rotundifolia* ont été étudiés dans les populations de backcross. Cependant, certains caractères, dont l'observation était très chronophage, n'ont pas pu être évalués dans le cadre de ce travail. Ainsi, la faible pilosité du bourgeon, établie comme spécifique à *M. rotundifolia*, n'a pas été observée dans les populations de backcross car cela nécessitait le prélèvement des rameaux et la dissection du bourgeon. Néanmoins, connaître le déterminisme génétique de ce caractère peut s'avérer utile pour son élimination lors des backcross. En effet, la faible pilosité du bourgeon de *M. rotundifolia* est susceptible de réduire la tolérance de la plante aux températures basses. De même, le contrôle génétique des métabolites volatiles et non volatiles de la baie n'a pas été déterminé en raison de la complexité de l'extraction et de sa durée (20 échantillons par semaine). L'extraction des métabolites secondaires de tous les individus de toutes les populations aurait nécessité trois mois de travail. Les travaux réalisés sur les accessions de *M. rotundifolia* et de *V. vinifera* ont permis de mettre en évidence un nombre élevé de métabolites spécifiques de *M. rotundifolia*. Comme nous avons pu le constater sur les feuilles, le déterminisme génétique des métabolites secondaires est particulier et son étude a fourni des informations indispensables pour l'élimination de ces composés pendant l'introgression. Déterminer le contrôle génétique des métabolites volatiles et non volatiles spécifiques des baies de *M. rotundifolia* est donc primordiale pour éliminer ces composés, et notamment ceux liés au goût foxé de la baie. De plus, comparer le déterminisme génétique des composés volatiles sous leur forme libre et sous leur forme glycosylée s'avère intéressante, certains étant spécifiques de *M. rotundifolia* soit sous une des deux formes soit sous les deux formes. Par ailleurs, l'identification de quelques ions, détectés en LC-MS dans les feuilles et dans les baies, a pu être réalisée. Mais, étant donnée la complexité des métabolites impliqués, et notamment la grande diversité de la famille des ellagitannins qui semble fortement différencier *M. rotundifolia* de *V. vinifera*, cette identification n'a pas pu aboutir pour tous les ions détectés. Identifier les ions détectés comme spécifiques dans les feuilles et dans les baies de *M. rotundifolia* en LC-MS peut mettre en évidence les familles de composés ainsi que les voies métaboliques différenciant les deux espèces.

Lors de l'étude morphologique des populations de backcross, certains caractères se sont montrés plus complexes que ce qui avait été observé chez *M. rotundifolia* et *V. vinifera*. En particulier,

la ramification des vrilles s'est manifestée dans la descendance soit sous la forme d'un des deux parents, simples chez *M. rotundifolia* et complexes chez *V. vinifera*, soit sous un mélange des deux formes sur le même individu. Ce dernier phénotype était inattendu. Lors de l'analyse du déterminisme génétique, ce caractère a été traité comme un caractère binaire, absence ou présence de vrilles simples. Cependant, l'analyse n'a pas abouti à un résultat. Ce caractère étant très spécifique de *M. rotundifolia* et facilement identifiable, la connaissance de son contrôle génétique est essentielle en sélection pour revenir à un phénotype *V. vinifera*. Pour cela, il est nécessaire de faire une échelle de notation plus complète voire fondée sur plusieurs critères, tels que le taux de vrilles simples présentes sur le pied ou le degré de ramification des vrilles (simple, bifide, trifide,...).

iii. Recherche des gènes responsables des caractères spécifiques de *M. rotundifolia*

L'analyse du déterminisme génétique des caractères et métabolites secondaires spécifiques de *M. rotundifolia* a permis la détection de plusieurs facteurs génétiques. Fin 2016, *M. rotundifolia* cv. Regale a été séquencée grâce à la technique PacBio®. L'assemblage des séquences est en cours et fournira à terme une séquence de référence pour *M. rotundifolia*. Grâce à cette séquence, il sera possible de rechercher les gènes associés aux facteurs génétiques détectés dans cette étude. La connaissance des gènes responsables des caractères spécifiques de *M. rotundifolia* et leur caractérisation fournira de précieuses informations sur l'expression des caractères phénotypiques de *M. rotundifolia* et également pour l'élimination de tels caractères dans le processus d'introgession.

b. Perspectives pour la sélection

i. Adaptation la stratégie de sélection

Les résultats obtenus lors de cette thèse donnent des indications importantes pour adapter la stratégie de sélection. En effet, en confrontant les données de recombinaison et de phénotypage, il est possible d'identifier les points cruciaux à contrôler lors de l'introgession.

L'un des points importants dans tout processus d'introgession est d'éliminer au maximum les régions de génome du parent donneur, notamment sur les chromosomes porteurs de facteurs d'intérêt tels que les gènes de résistance. Ce point s'appuie sur le mécanisme des recombinaisons. Étant donnée la suppression des recombinaisons interspécifiques dans les niveaux avancés de pseudo-backcross, il est important de valoriser au mieux les recombinaisons ayant lieu pendant la méiose de l'hybride F1. Ainsi, les chromosomes 12 et 18, porteurs des gènes de résistance, et éventuellement les chromosomes 6 et 8, porteurs des QTL de tardivité de *M. rotundifolia*, doivent être au centre de l'attention dans le choix du géniteur en BC1. En outre, pour augmenter la probabilité d'avoir une recombinaison entre le facteur d'intérêt et celui contrôlant les caractères défavorables, il est nécessaire de produire de grandes populations. Ainsi, il est important de développer des méthodes ou choisir des variétés de *V. vinifera* maximisant le rendement en graines viables des croisements. Ce choix de géniteurs impacte à la fois le croisement initial entre *V. vinifera* et *M. rotundifolia* ainsi que le premier backcross, F1 x *V. vinifera*.

Une fois sélectionné l'individu de BC1 ayant recombiné au plus près des facteurs d'intérêt, l'élimination des régions issues de *M. rotundifolia* sur les autres chromosomes est relativement facile dans les croisements suivants. En effet, les recombinaisons interspécifiques étant rares lors de ces croisements, la transmission de ces régions est de type tout ou rien. Pour chaque région issue de *M. rotundifolia*, il y a donc environ une chance sur deux de l'éliminer totalement.

ii. Développement de la technique de GBS en sélection

Lors du processus d'introgession, la sélection assistée par marqueurs (SAM) permet de suivre la conservation du facteur de résistance, ou de tout autre facteur d'intérêt, au cours des générations. Actuellement, dans le cadre de la création de variétés de vigne résistantes au mildiou et à l'oïdium, la

SAM repose essentiellement sur l'utilisation de marqueurs microsatellites. Ces marqueurs sont très appréciés pour leur polymorphisme élevé permettant facilement de différencier les allèles d'un génotype à une position donnée. Ces marqueurs sont donc très efficaces pour suivre la transmission d'un allèle lors de différents croisements. Cependant, pour suivre l'élimination de plusieurs régions chromosomiques, il est nécessaire de répéter les analyses avec autant de marqueurs microsatellites qu'il y a de régions à suivre. Ceci limite fortement la densité de marqueurs positionnés sur le génome et, de ce fait, réduit la précision du suivi.

Dans notre étude, l'utilisation du GBS a permis de baliser le génome de plusieurs milliers de marqueurs SNP, aboutissant à la détection de régions, issues de *M. rotundifolia*, de taille réduite (jusqu'à 2,12 Mb, soit 0,5 % du génome). À travers l'étude de la population de BC2, nous avons également pu constater que la connaissance des génotypes parentaux, et notamment du parent *M. rotundifolia* utilisé pour le croisement initial, n'était pas nécessaire pour la détection des régions issues de *M. rotundifolia*. En effet, les données de reséquençage de sept accessions de *M. rotundifolia* ont été suffisantes. On peut donc espérer que l'application de cette méthode, rapide et relativement peu coûteuse, dans le cadre de la sélection, permettrait non seulement de s'assurer de la conservation des facteurs d'intérêt lors des croisements, mais également de suivre de façon précise l'élimination des régions issues de *M. rotundifolia*.

De par leur histoire, les vignes américaines et les hybrides interspécifiques entre *V. vinifera* et les vignes américaines ont une très mauvaise image dans le contexte viticole français. L'un des objectifs de ce projet était donc d'identifier tous les caractères spécifiques de *M. rotundifolia* afin de faciliter leur élimination lors de l'introgession des caractères de résistance. Cependant, au cours de l'étude, il est apparu que *M. rotundifolia* est une espèce porteuse d'autres caractères pouvant présenter un intérêt pour la sélection, tels que la tardivité ou la tolérance aux températures élevées. Dans le contexte actuel, il est donc nécessaire de changer la vision négative des hybrides interspécifiques dont l'intérêt ne se limite pas seulement à l'apport de résistances aux maladies.

Annexes

Annexe 1 : Données supplémentaires de l'article « Introgression reshapes recombination distribution in grapevine interspecific hybrids »

S1 Table. Number of individuals genotyped by GBS and with SSRs in each mapping population.

S2 Table. Covering rates of the chromosomes of the parental maps of the BC1, BC2 and BC4 populations.

S3 Table. Contraction rates of the chromosomes of the parental maps of the BC1, BC2 and BC4 populations.

S4 Table. Segregation distortion of eight SSR markers on BC1 hybrid map before and after population size reduction.

S1 Fig. Parental maps of the BC1 (a), BC4 (b) and BC2 (c) populations.

S2 Fig. Evolution of the segregation distortion along the chromosomes of the hybrid parents of the BC1 (a) and BC2 (b) populations and of the *V. vinifera* parent of the BC2 population (c).

S1 Table. Number of individuals genotyped by GBS and with SSRs in each mapping population.

	GBS	SSR
BC1	177	68
BC2	222	210
BC4	78	79
Total	477	357

S2 Table. Covering rates of the chromosomes of the parental maps of the BC1, BC2 and BC4 populations.

Population	BC1		BC2		BC4	
	♂ Cabernet Sauvignon	♀ 8624	♂ Syrah	♀ 22-8-78	♂ Nebbiolo	♀ 1771P
Chromosome 1	0.97	0.91	0.95	0.65	0.97	0.88
Chromosome 2	0.96	0.99	0.91	0.98	0.95	0.96
Chromosome 3	0.88	0.95	0.98	0.93	0.88	0.90
Chromosome 4	0.97	0.99	0.96	0.97	0.96	0.97
Chromosome 5	0.97	0.98	0.95	0.80	0.97	0.95
Chromosome 6	0.95	0.96	0.73	0.72	0.78	0.89
Chromosome 7	0.97	1.00	0.99	0.99	0.99	0.99
Chromosome 8	0.97	1.00	0.22	1.00	0.99	0.99
Chromosome 9	0.94	0.99	0.88	0.99	0.98	0.97
Chromosome 10	0.79	0.98	0.96	0.97	0.97	0.79
Chromosome 11	0.94	0.98	0.86	0.11	0.91	0.93
Chromosome 12	0.93	1.00	0.94	0.98	0.97	0.91
Chromosome 13	0.88	0.90	0.99	0.99	0.99	0.99
Chromosome 14	0.91	0.98	0.98	0.99	0.95	0.98
Chromosome 15	0.94	0.75	0.97	0.97	0.94	0.92
Chromosome 16	0.94	0.92	0.68	0.99	0.97	0.95
Chromosome 17	0.87	0.91	0.88	0.91	0.88	0.88
Chromosome 18	0.98	0.99	0.97	0.99	0.99	0.93
Chromosome 19	0.95	0.99	0.97	0.96	0.96	0.97
Total	0.93	0.96	0.89	0.90	0.95	0.94

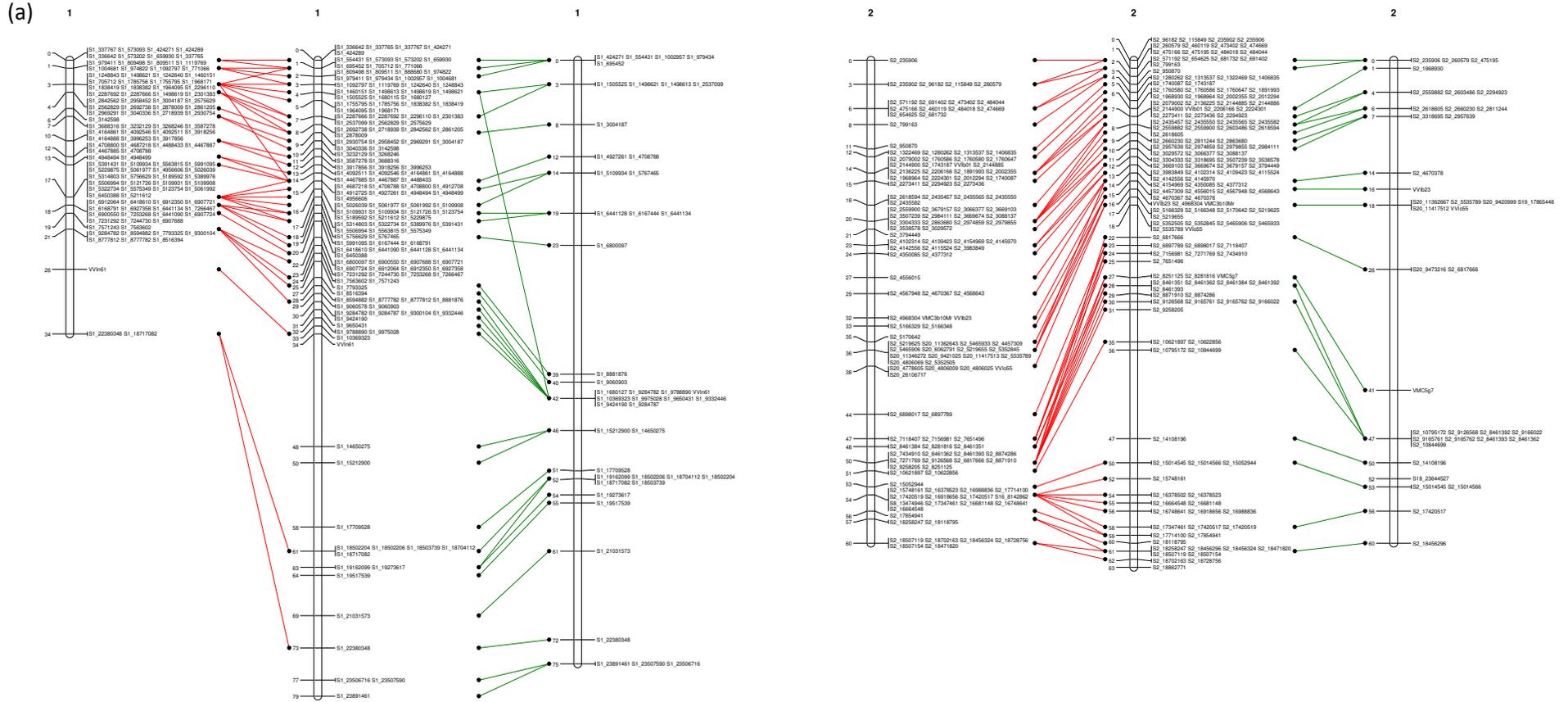
S3 Table. Contraction rates of the chromosomes of the parental maps of the BC1, BC2 and BC4 populations. Chromosomes poorly covered are in italics. Contraction rates for these chromosomes are not representative of their recombination.

Population	BC1		BC2		BC4	
	♂ Cabernet Sauvignon	♀ 8624	♂ Syrah	♀ 22-8-78	♂ Nebbiolo	♀ 1771P
Chromosome 1	0.96	0.46	1.04	<i>1.73</i>	0.89	0.61
Chromosome 2	0.98	0.97	1.02	1.12	0.77	1.06
Chromosome 3	0.72	0.96	0.96	0.94	0.90	0.63
Chromosome 4	1.37	1.10	0.92	1.05	0.97	0.86
Chromosome 5	1.16	1.00	0.83	0.76	1.01	1.03
Chromosome 6	1.04	0.80	<i>0.57</i>	<i>0.51</i>	0.81	1.10
Chromosome 7	1.45	0.85	1.14	0.88	1.41	1.00
Chromosome 8	1.01	1.15	<i>0.43</i>	0.75	1.07	0.66
Chromosome 9	0.97	0.69	0.76	0.63	0.86	0.82
Chromosome 10	0.98	0.80	0.91	1.17	0.87	0.82
Chromosome 11	0.98	1.00	0.87	<i>1.95</i>	1.09	1.39
Chromosome 12	0.99	0.99	0.67	0.70	0.95	0.56
Chromosome 13	1.37	<i>1.16</i>	0.85	1.01	0.76	0.68
Chromosome 14	0.69	0.87	0.69	0.77	0.84	0.53
Chromosome 15	0.88	0.62	1.19	0.93	1.04	0.63
Chromosome 16	0.78	1.07	<i>0.52</i>	0.79	0.84	0.91
Chromosome 17	1.44	1.18	1.16	1.19	0.96	0.92
Chromosome 18	0.88	0.80	0.89	1.06	0.95	0.52
Chromosome 19	0.73	0.72	0.87	0.77	0.83	0.88
Total	1.02	0.90	0.85	0.93	0.94	0.80

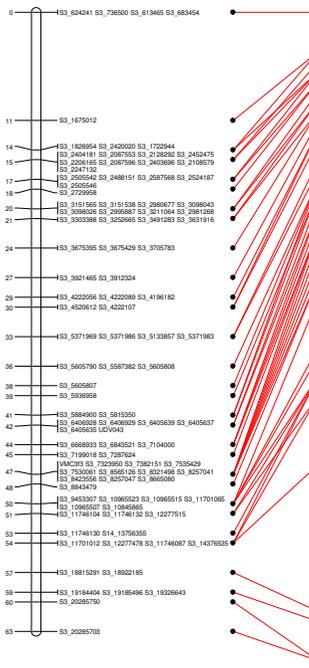
S4 Table. Segregation distortion of eight SSR markers on BC1 hybrid map before and after population size reduction. Segregation distortion is estimated by a χ^2 -test comparing observed and expected allelic Mendelian ratios, before (initial p-value, 177 individuals) and after (final p-value, 68 individuals) population size reduction.

Chromosome	SSR marker	Initial p-value n = 177	Final p-value n = 68
1	VVln61	0.001	0.014
4	VVlp25b	0.048	0.033
	VMC2e10	0.135	0.008
11	VVlv35a	0.017	0.001
13	VVln62	0.323	$4 \cdot 10^{-4}$
	VMC3d12	0.102	$4 \cdot 10^{-7}$
	VMC3b12	0.144	0.002
15	VVlm42b	$1 \cdot 10^{-4}$	0.003

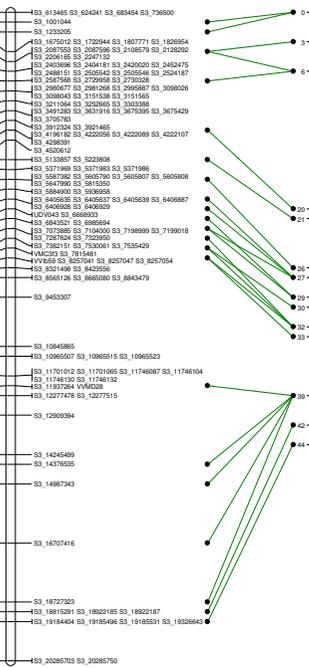
Figure S1: Parental maps of the BC1 (a), BC4 (b) and BC2 (c) populations. Genetic maps are on the left for the hybrid parent and on the right for the *V. vinifera* parent. In the middle, all the markers of the genetic maps are represented at their physical position. Markers mapped on genetic and physical maps are linked by a red line for the hybrid parent and a green line for the *V. vinifera* parent.



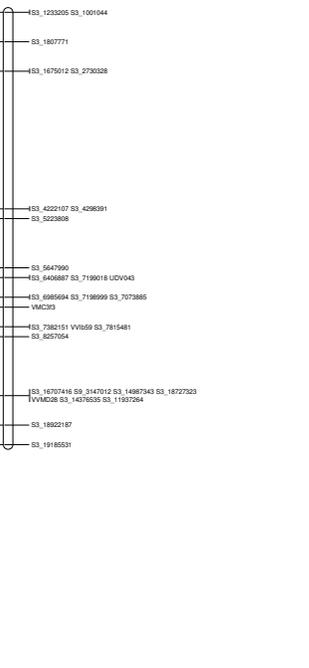
3



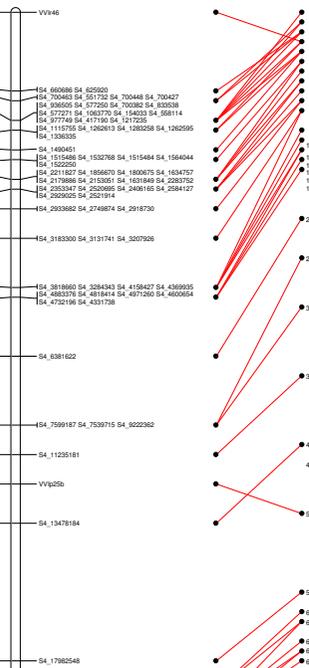
3



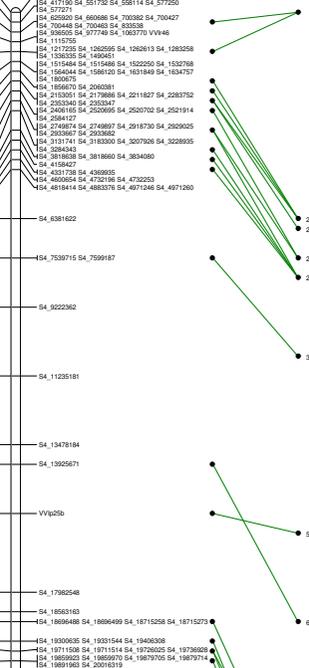
3



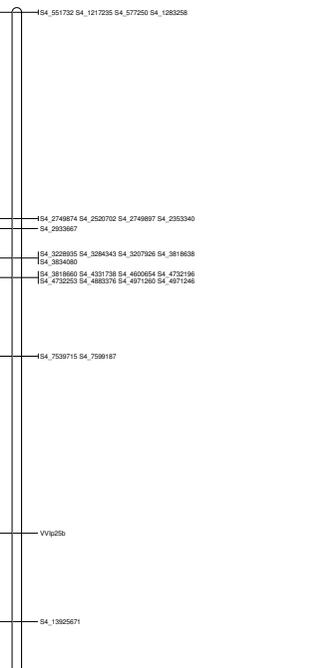
4



4



4



3



3



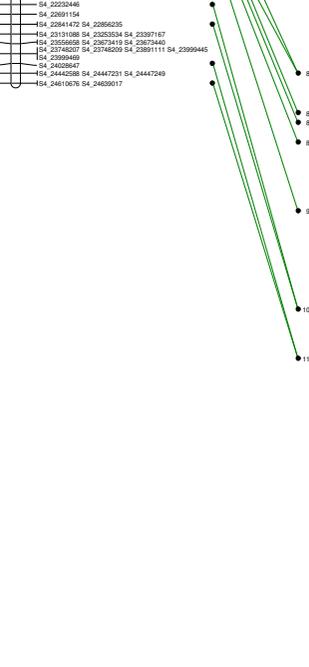
3



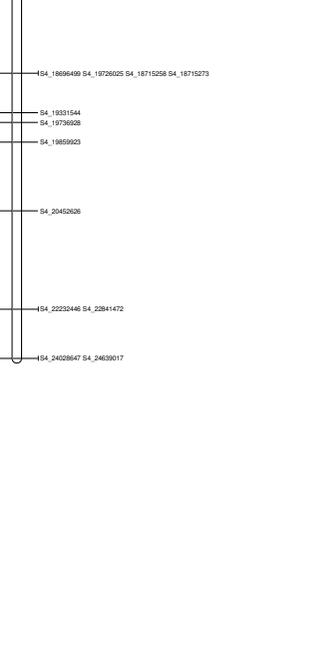
4

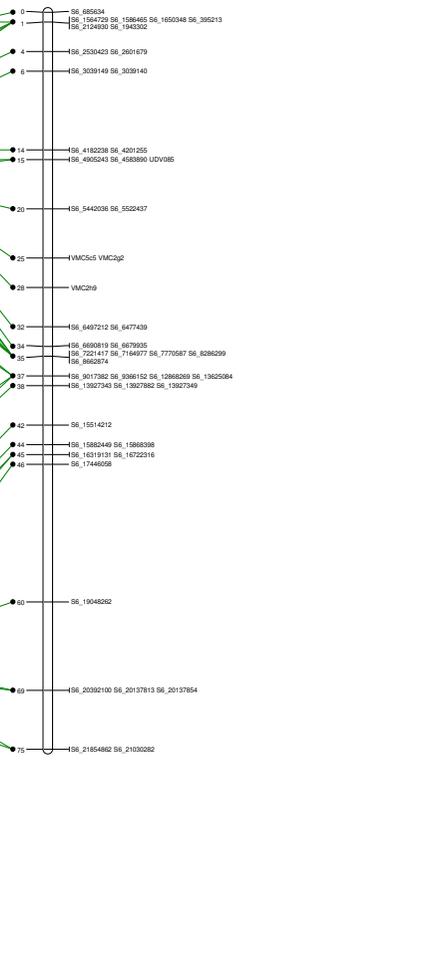
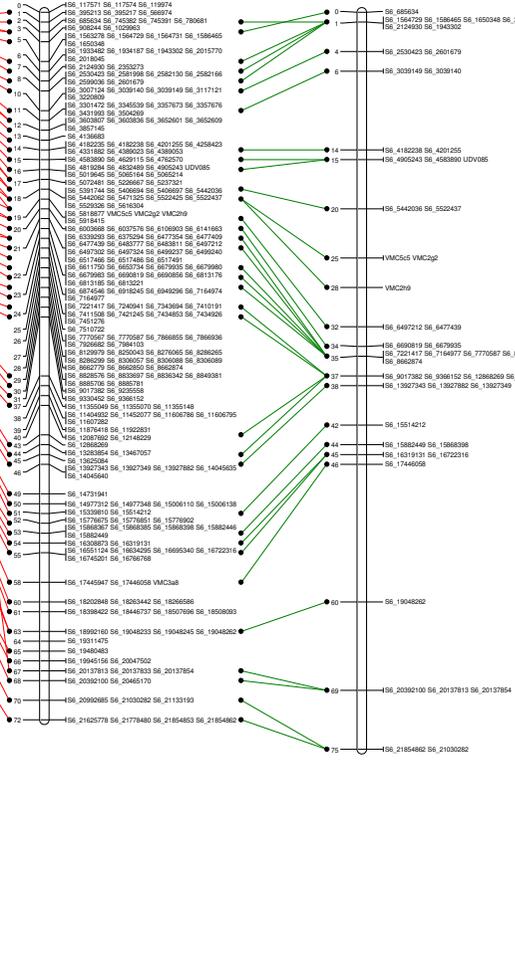
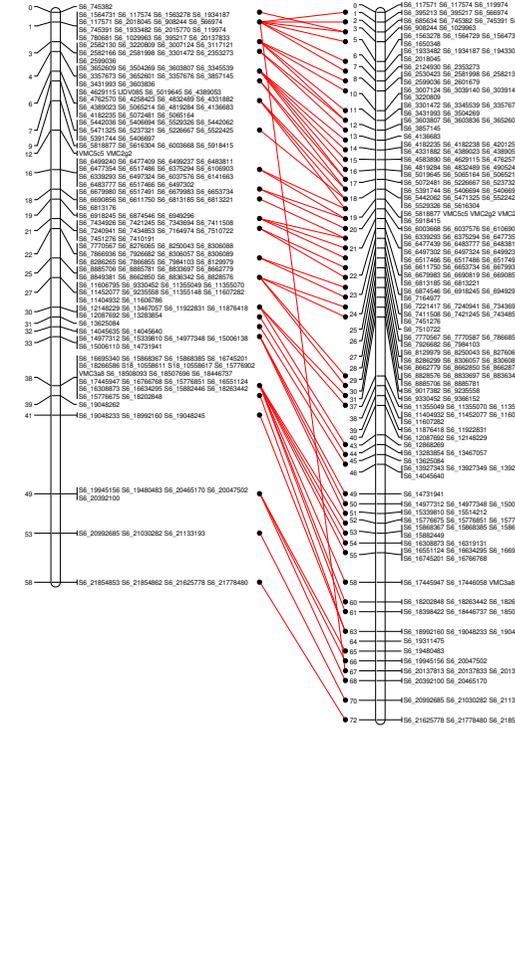
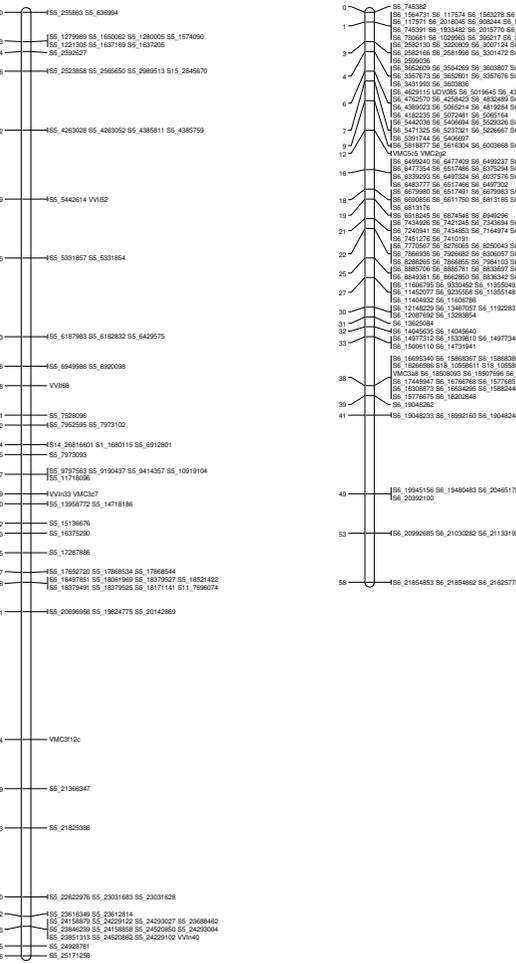
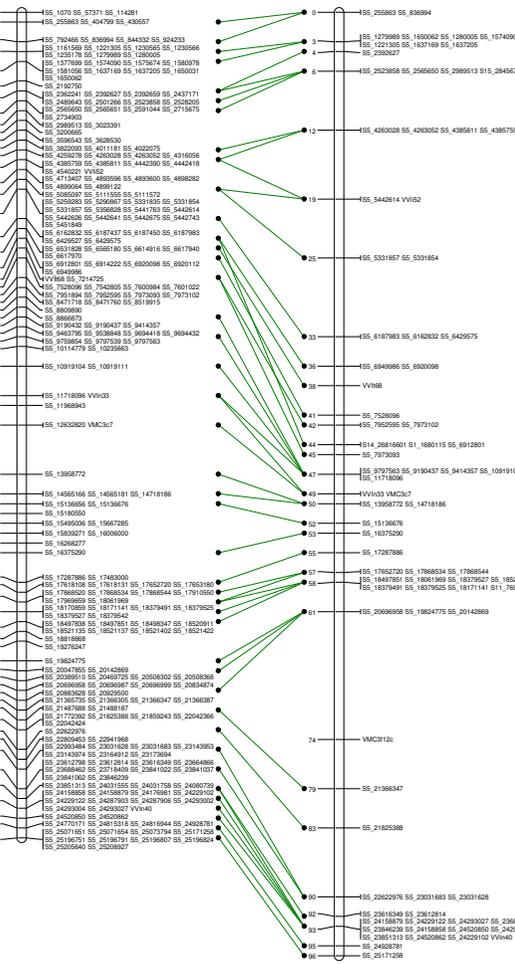
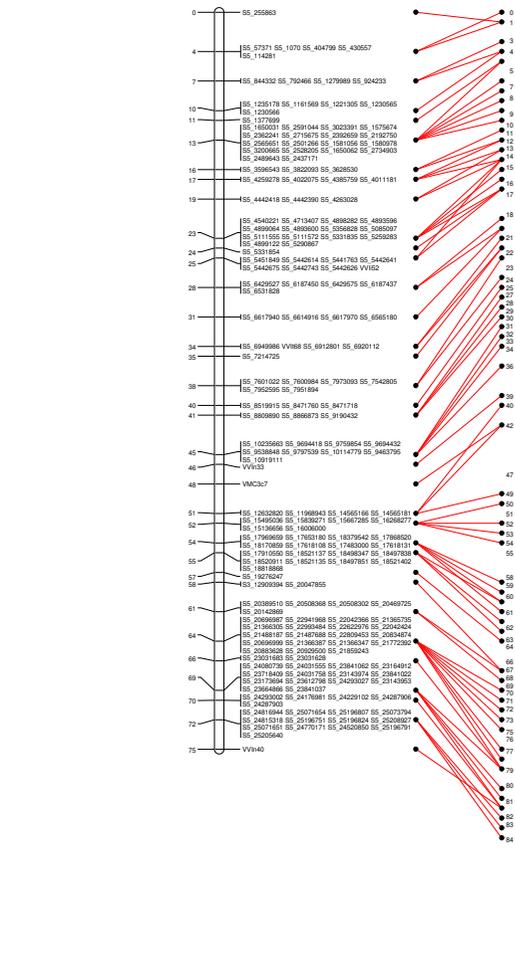


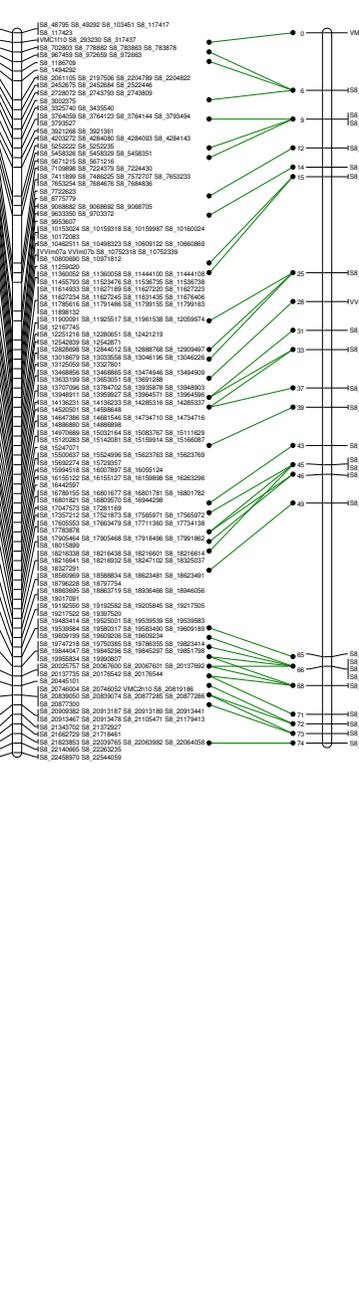
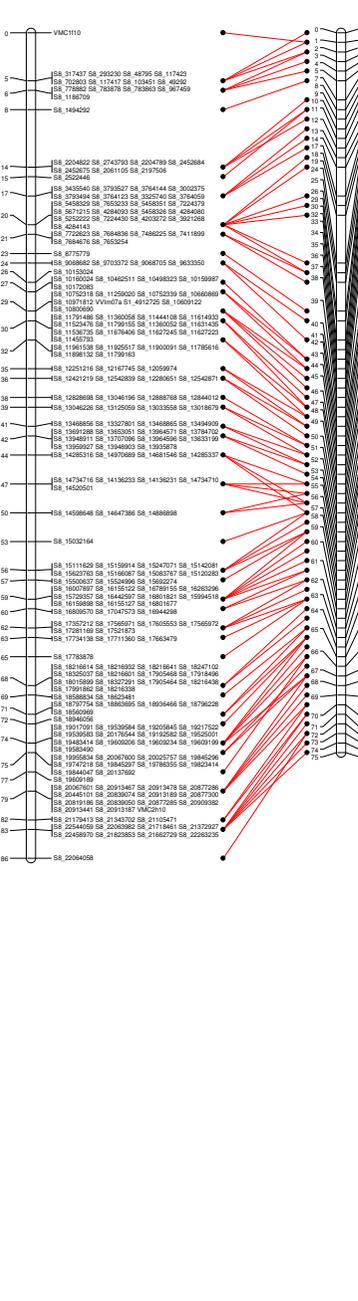
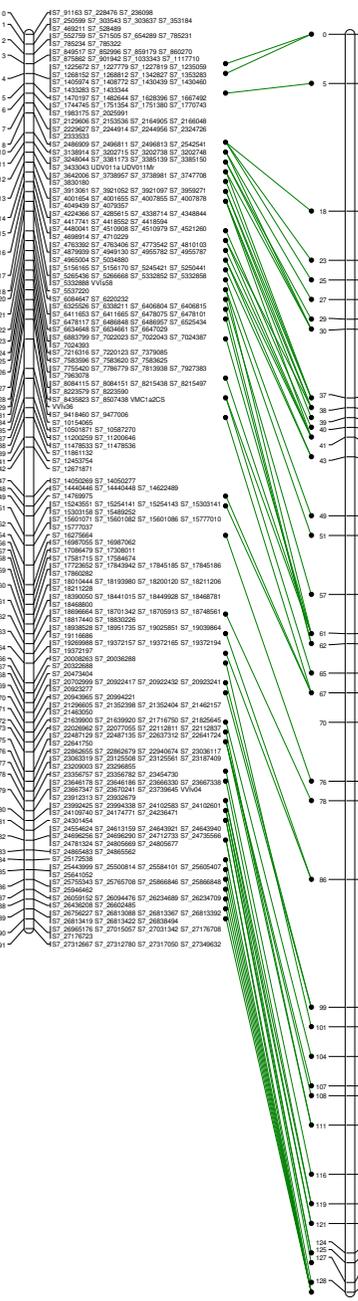
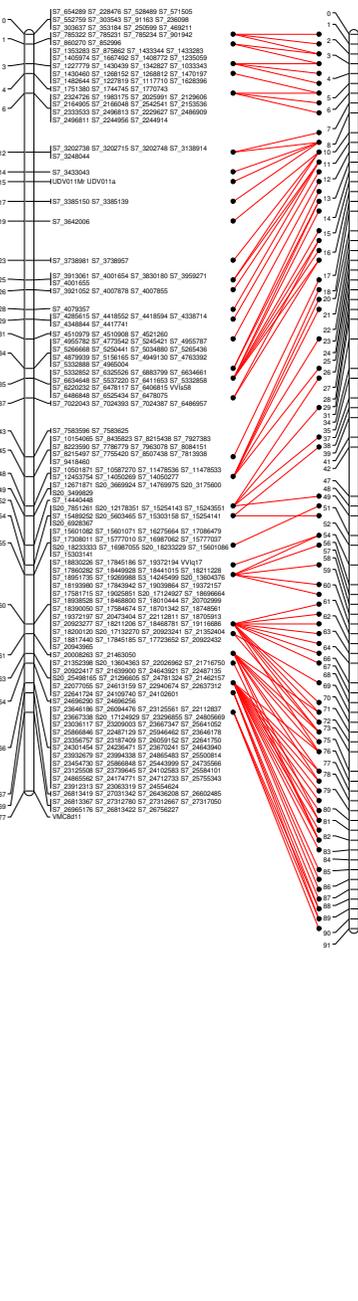
4

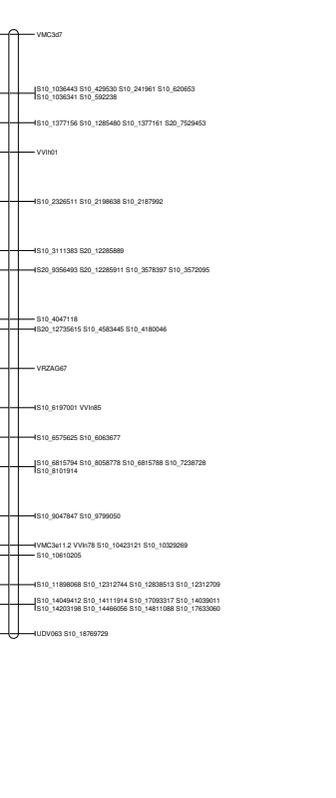
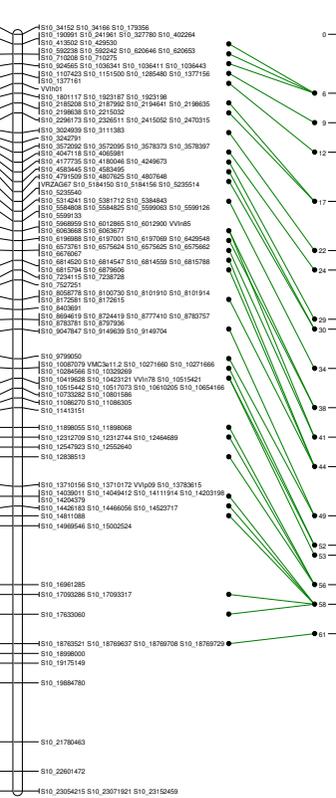
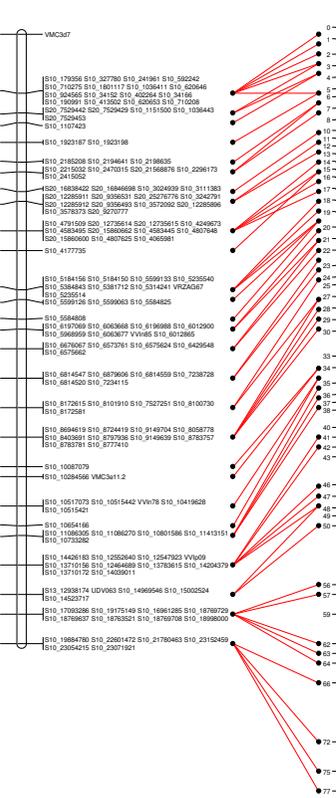
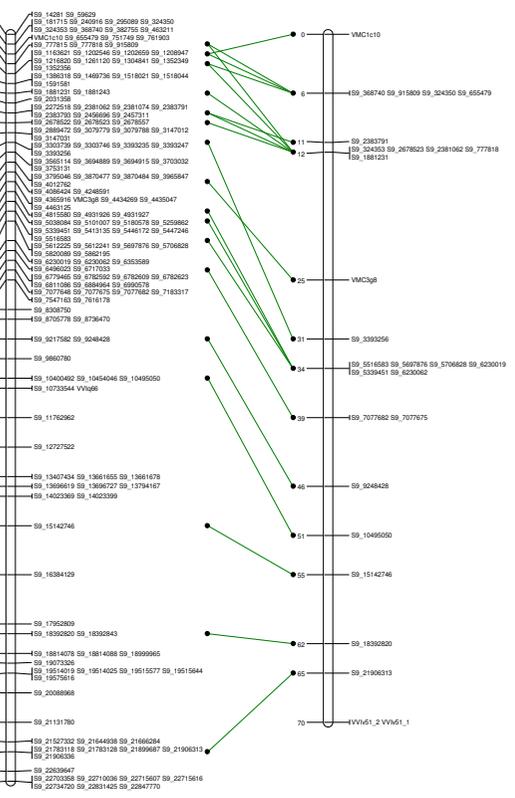
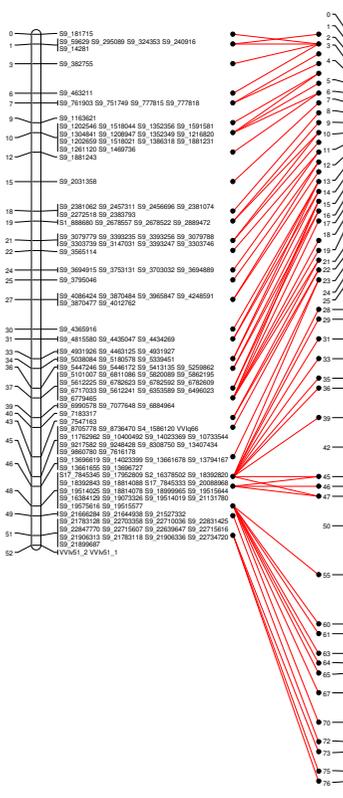


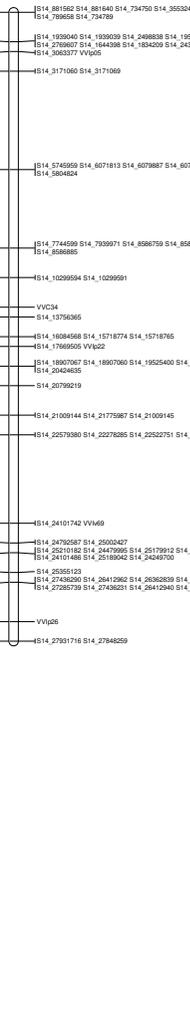
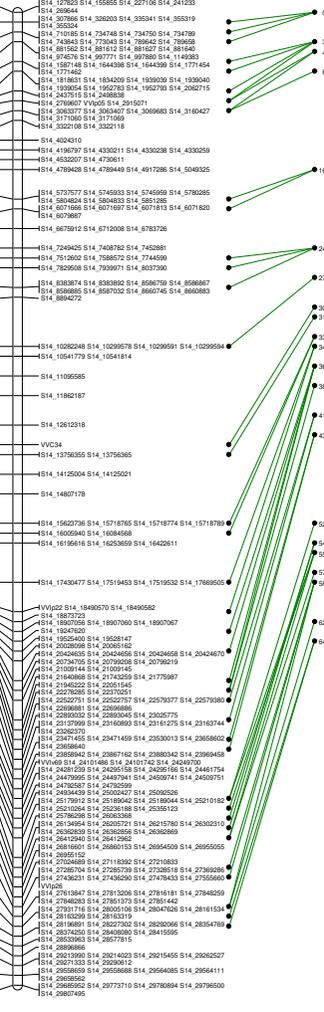
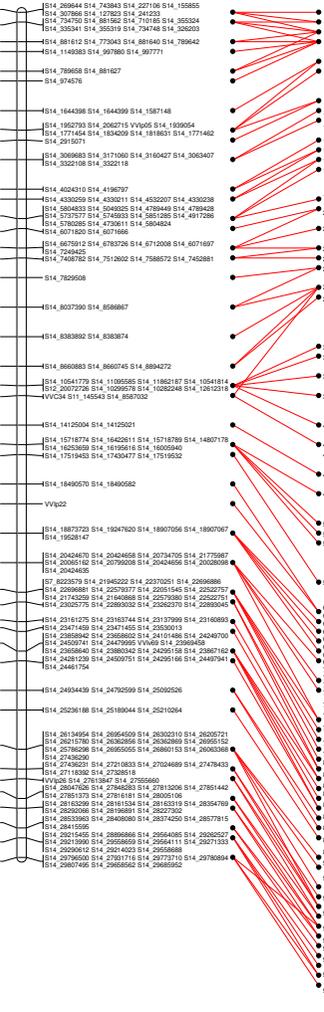
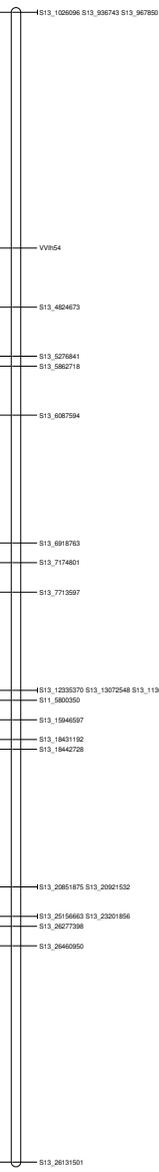
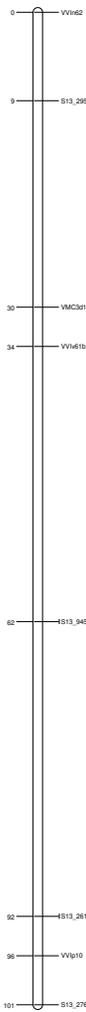
4

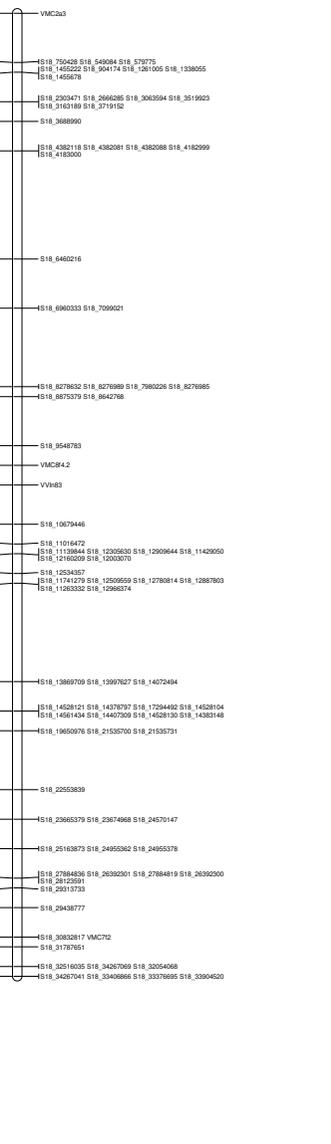
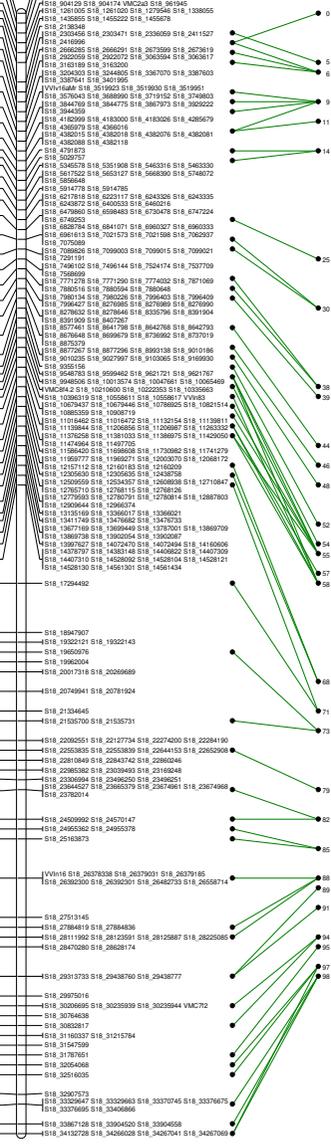
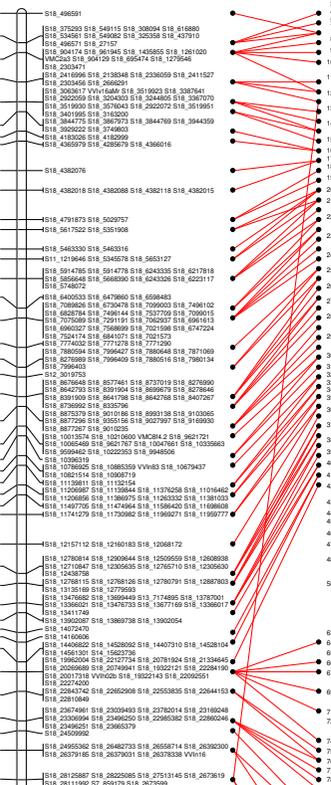
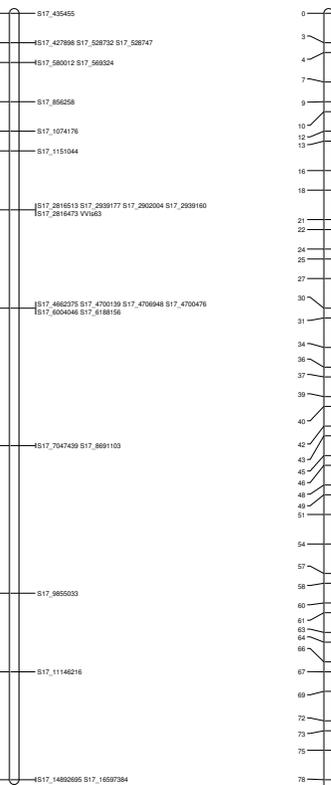
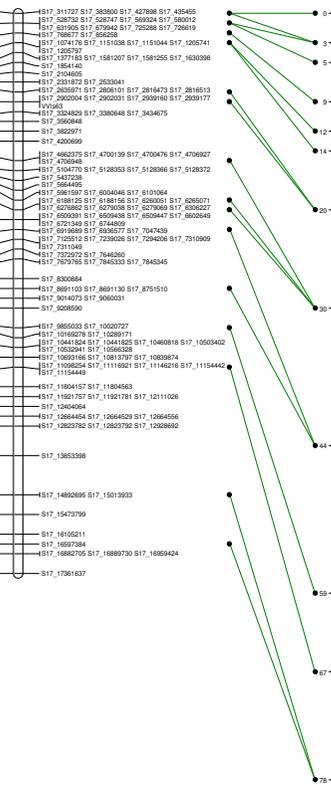
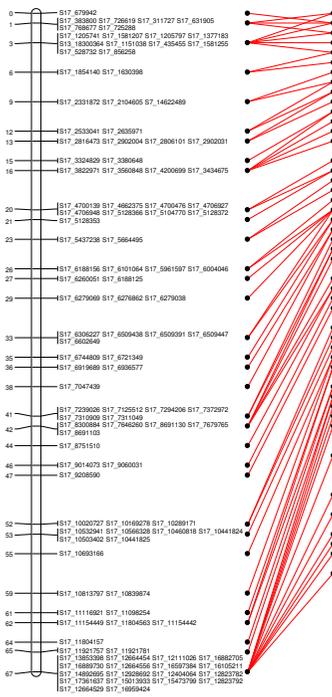












0 S19_30209 S19_30549 S19_31118 S19_103102
 S19_09704 S19_30283 S19_37341 S19_59445
 S19_136781 S19_427841

6 S19_1178744

8 S19_1475955 S19_2305656 S19_189384 S19_1081810
 S19_2108919 S19_1802546 S19_175115 S19_2021790
 S19_1720644 S19_1931428 S19_2422744

9 S19_2050549 S19_258441 S19_328865 S19_2129005
 S19_2820397 S19_2701022 S19_2078395 S19_1981811
 S19_3086688 S19_2706641 S19_1084772 S19_2700621
 S19_3098760 S19_236886 S19_3086736

11 S19_262182 S19_233220 S19_361928 S19_3333259
 S19_3500774 S19_2338637

14 S19_381103 S19_2866684 S19_3858495 S19_3825225
 S19_3752618
 S19_2761982 VVq11

16 S19_5238886 S19_4873872 S19_5444399

18 S19_5641210 S19_5427711

20 S19_6078759 S19_6179020 S19_5928202 S19_5928094
 S19_5848182 S19_5728414

21 S19_6284597 S19_6414154 S19_6688676 S19_6401303
 S19_6685571 S19_6537570 S19_6837923

23 S19_6812802 S19_6831784 S19_678164 S19_6813798
 S19_6778182 S19_6853747 S19_6788252 S19_7202842
 S19_6706830

26 S19_7392020

27 S19_7444224 S19_7444190 S19_7816243 S19_7443848
 S19_7443816 S19_7443805 S19_7710284 S19_7732084
 S19_7471948 S19_7785220 S19_7471715 S19_7736159

29 S19_7751400 S19_7471802
 S19_8129000 S19_8117008 S19_8244628
 S19_8298714

32 S19_8597556 S19_8688295 S19_8597544 S19_8668208

33 S19_8779786 S19_8877053 S19_8763765

38 S19_10618081

39 S19_10618055 S19_10551182 S19_10666000 S19_10807039

41 S19_16509043 S19_18057360 S19_22123877

44 S19_21344700 S19_16182250 S19_22039765

47 S19_6243872 S19_19120484 S19_19429756 S19_18732047
 S19_19432032 S19_19390201

50 S19_20181009
 S19_20697731

54 S19_22739428 S19_22862203 S19_22574531 S19_22862286
 S19_22751983

55 S19_22814486

57 S19_23479049 S19_23479063 S19_23439673 S19_23232869
 S19_23912959 S19_23232869

59 S19_23863795 S19_24243651 S19_23868886 S19_24562589
 S19_24478668 S19_24180127 S19_23863792 S19_26224689

0 S19_59846 S19_59677 S19_59754 S19_136781
 S19_191953

1 S19_2761419 S19_305299 S19_305499
 S19_211310 S19_35283 S19_37341 S19_375004
 S19_427620 S19_427841 S19_470588

2 S19_525605 S19_575999
 S19_1193144

3 S19_1475955 S19_1484372
 S19_170844 S19_1787115 S19_1800354 S19_1896364

4 S19_1931428 S19_1981810 S19_1981811
 S19_2021790 S19_2079386 S19_2108919 S19_2129005

5 S19_2305656

6 S19_258441 S19_2534413

7 S19_2820397 S19_2705959 S19_2700602 S19_2700621
 S19_2901202 S19_2939676 S19_3098760 S19_3098771

8 S19_3086688 S19_3086736 S19_3086736
 S19_3098651 S19_3208686

9 S19_3500774 S19_3532020 S19_3338637 S19_3500774
 S19_3521182 S19_3619284 S19_3619284 S19_3661008
 S19_3615153 S19_3825225 S19_3858495

11 S19_4873872

12 S19_5444399 S19_5444399 S19_5427711

13 S19_5641210 S19_5702844

14 S19_5928202 S19_5928202 S19_6048182 S19_6078759

15 S19_6078759

16 S19_6284597 S19_6333709 S19_6401303 S19_6414154
 S19_6502070 S19_6582975 S19_6592571 S19_6706830

17 S19_6706830 S19_6778182 S19_6778182

18 S19_6812802 S19_6831784 S19_6813798 S19_683747
 S19_7208242 S19_7252786 S19_7362020

19 S19_7443816 S19_7443816 S19_7443848 S19_7444190
 S19_7444224 S19_7471802 S19_7471948 S19_7471715

20 S19_770064 S19_7752084 S19_7754029 S19_7781559

21 S19_7855000 S19_7918043 S19_7844122
 S19_8117008 S19_8120086 S19_8244628 S19_8298714

22 S19_8597544 S19_8597556

23 S19_8688295 S19_8688295 S19_8752975 S19_8779785
 S19_8877053

24 S19_9588186 S19_9588221 S19_9748616

25 S19_9978689

26 S19_10551182 S19_10616555 S19_10616001 S19_10666000
 S19_10807039

27 S19_16182050

28 S19_16509043

29 S19_16754925

30 S19_17855449 S19_17855482

31 S19_18507360

32 S19_19252687

33 S19_19120484 S19_19257892 S19_19390201

34 S19_19427956 S19_19433012

35 S19_20181009

36 S19_20697731

37 S19_21344700

38 S19_22574531 S19_22862286 S19_22862303

39 S19_22739428 S19_22751983

40 S19_23814486 S19_23232869 S19_23232869

41 S19_23439673 S19_23479049 S19_23479063

42 S19_23812959 S19_23863792 S19_23863795 S19_23868886

43 S19_24180127

44 S19_24243651 S19_24478668

45 S19_24562589

0 S19_2761419 S19_59677 S19_579999 VVq74
 S19_325605 S19_375004 S19_470588 S19_427620

1 S19_1981810

2 S19_2700621 S19_2700602

3 S19_2588461 S19_3098771

4 S19_3619249 S19_3661008

5 S19_5083822

6 S19_7255786

7 S19_8244628 S19_784122 S19_7444224

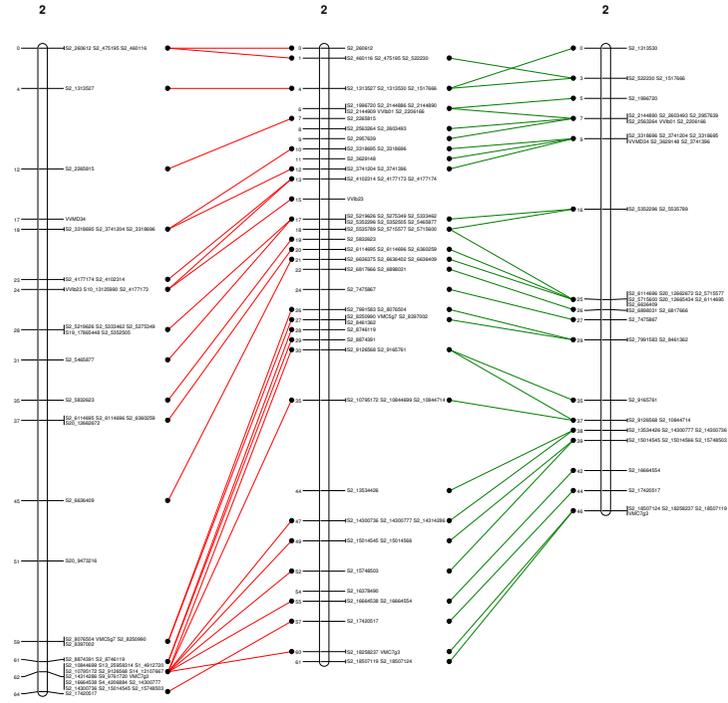
8 S19_9588186 S19_9748616 S19_9588221

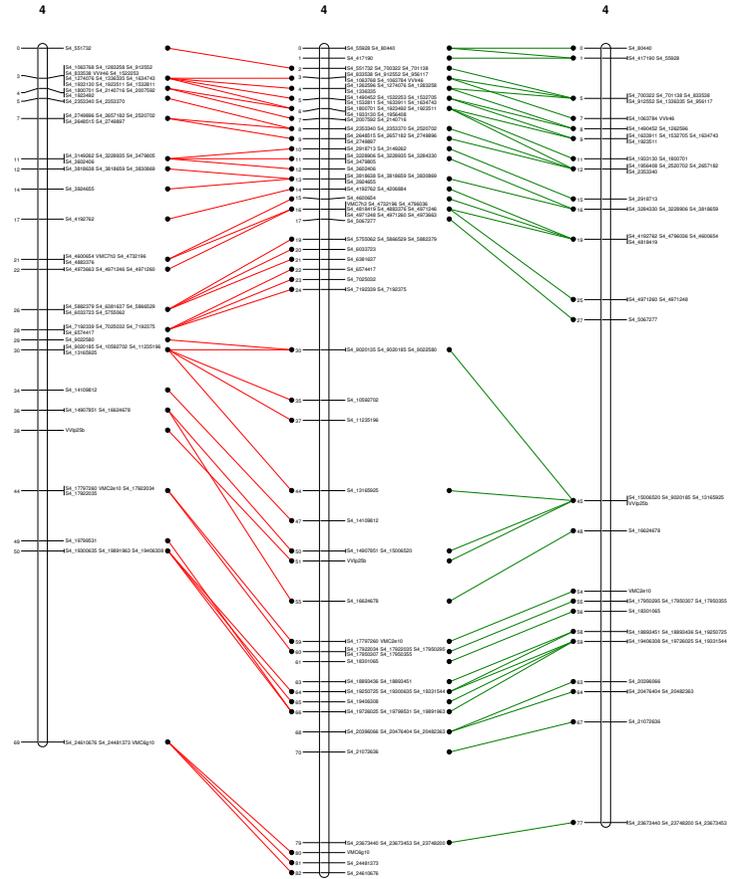
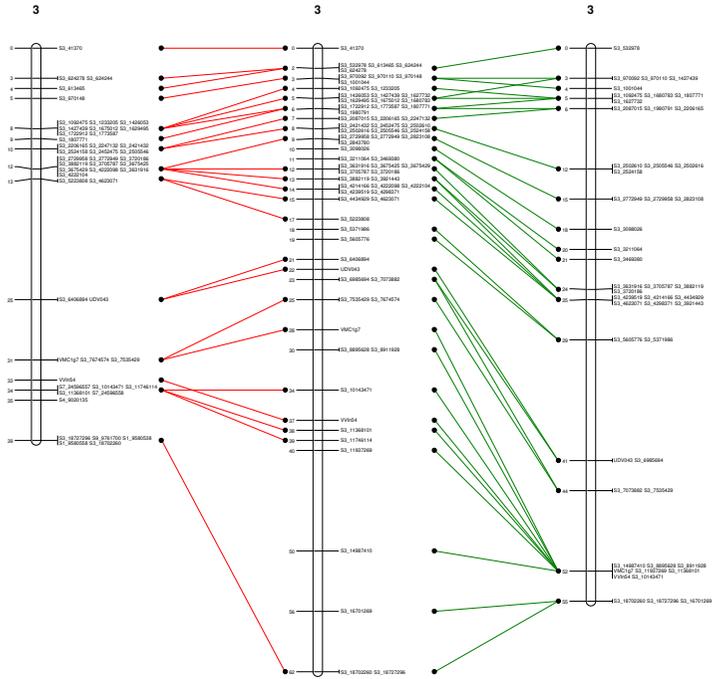
9 S19_16754925 S19_9978689 S19_17865482 VVq34

10 S19_19257892 S19_8749253

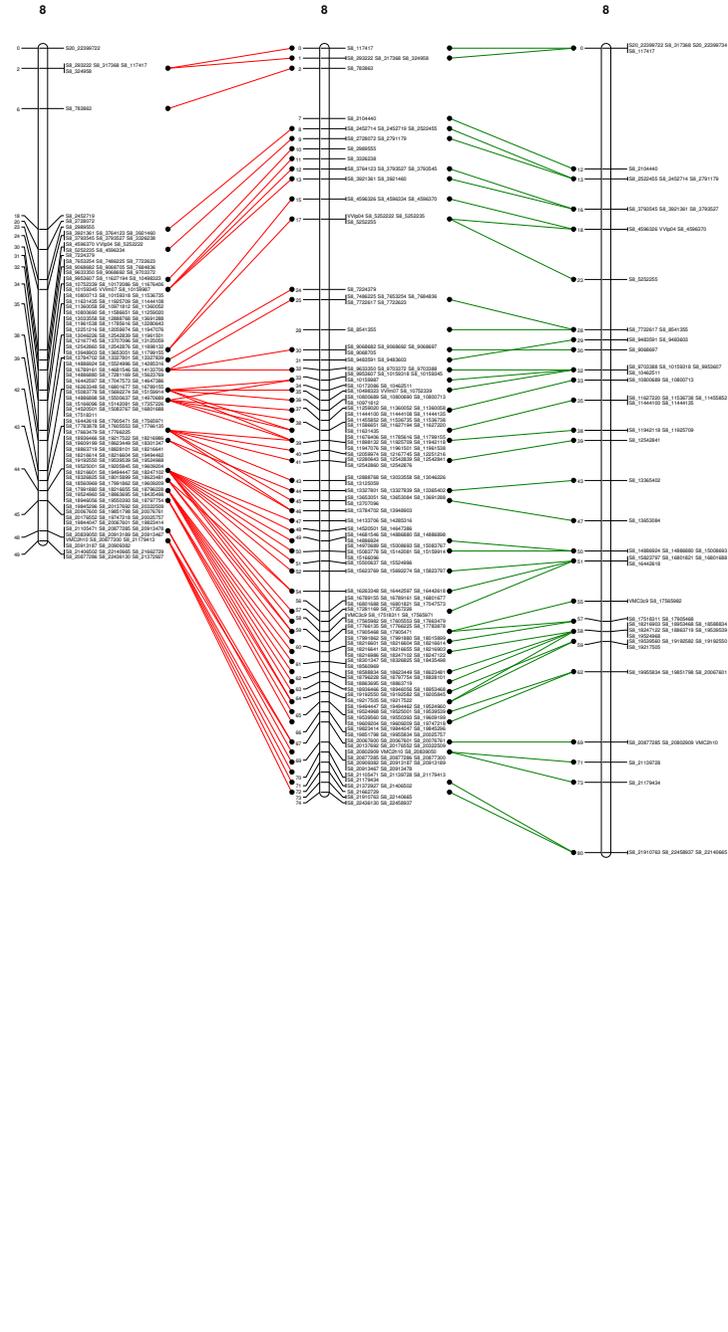
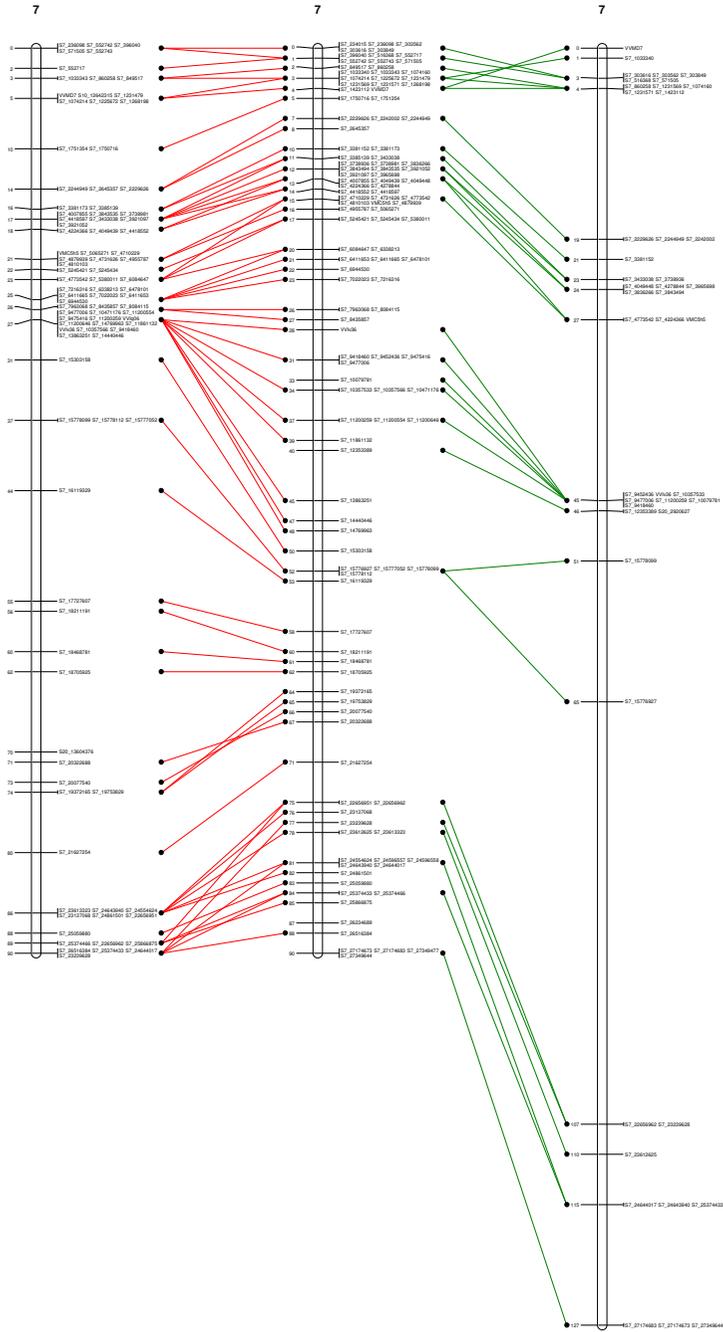
11 S19_23612959 S19_23479049

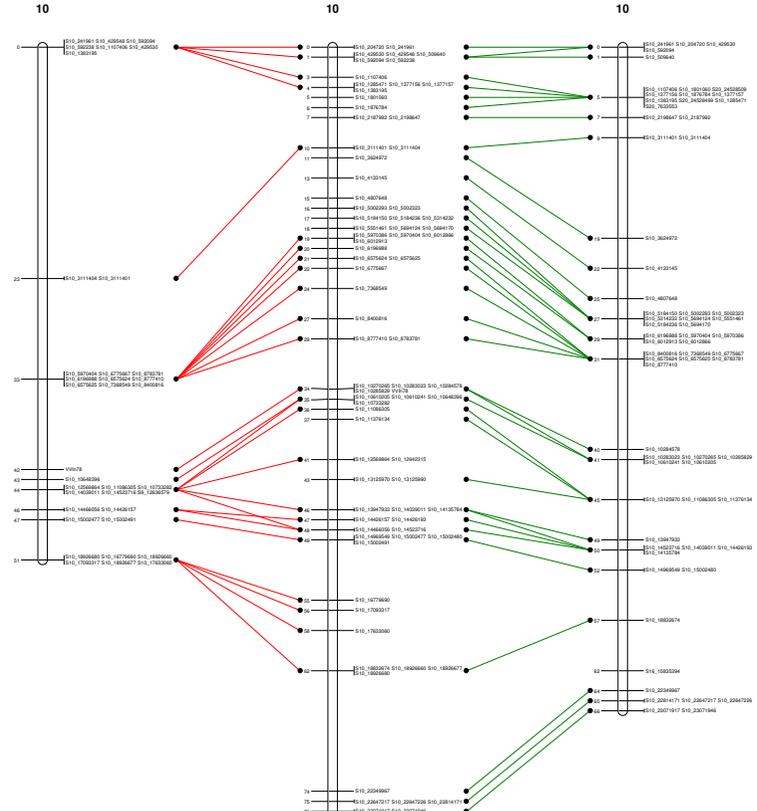
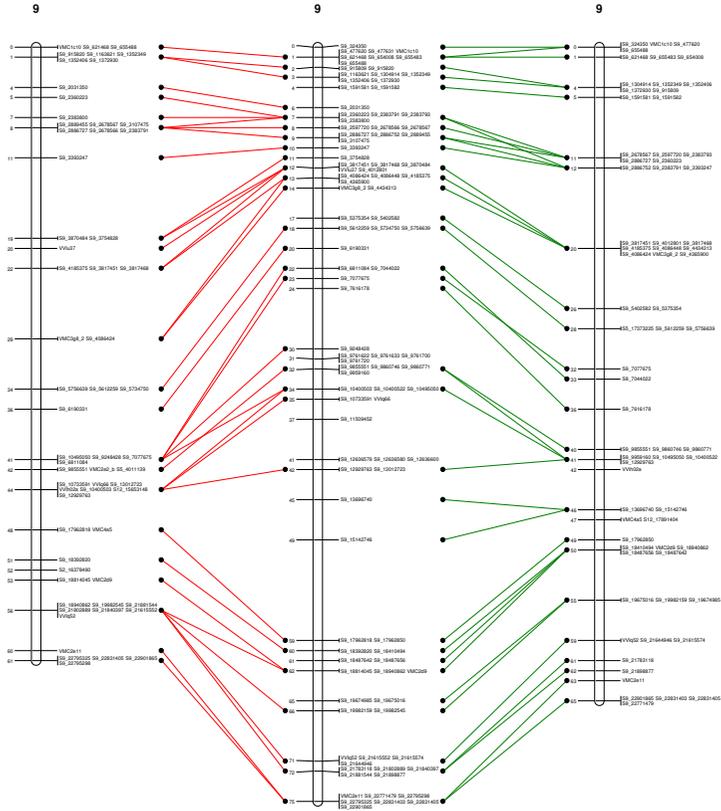
(b)

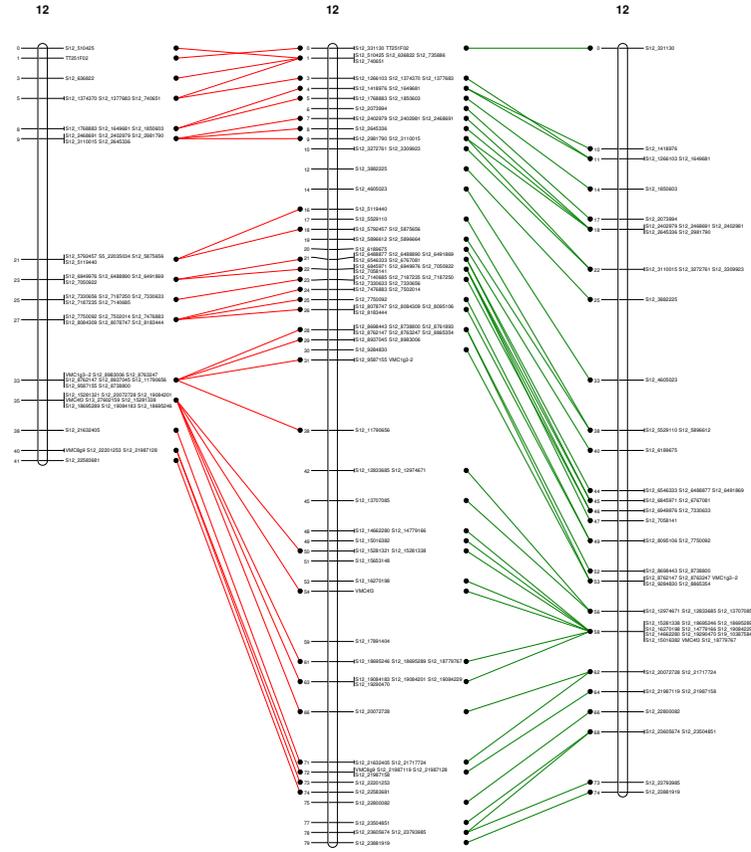
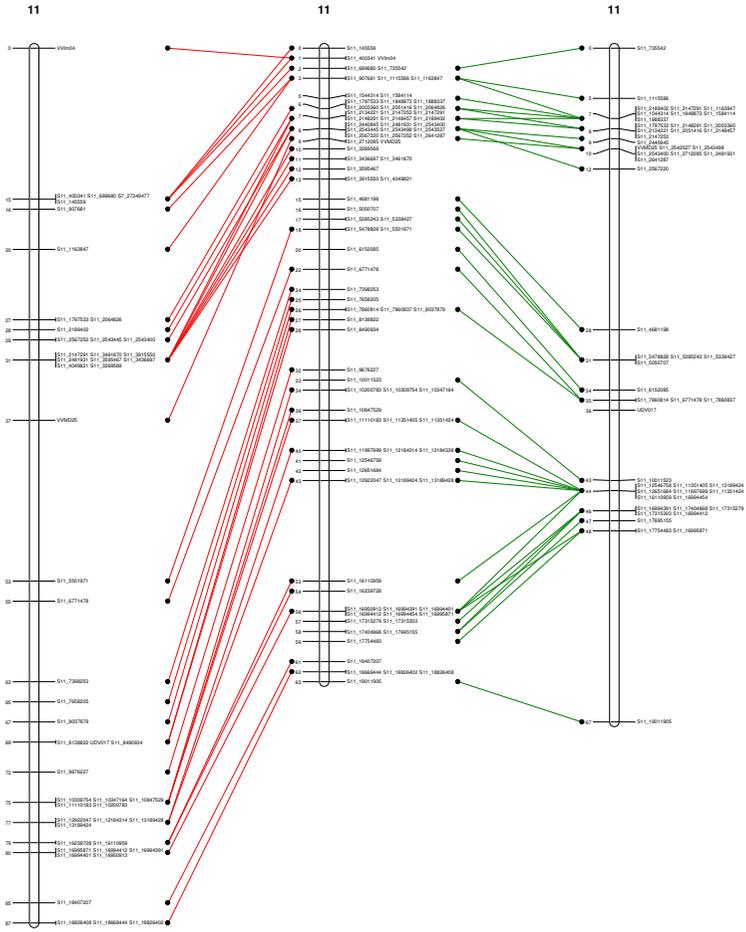




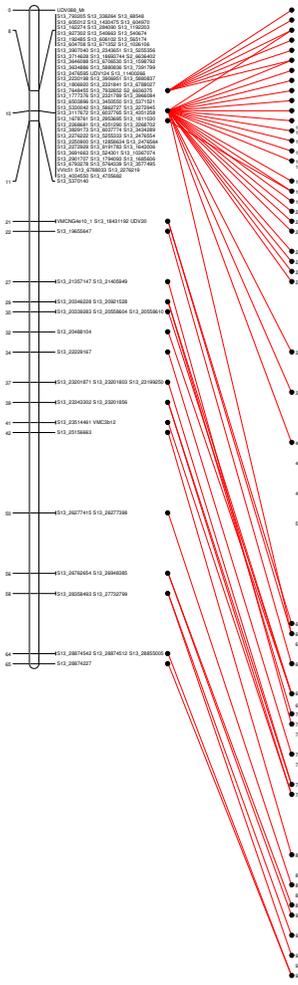




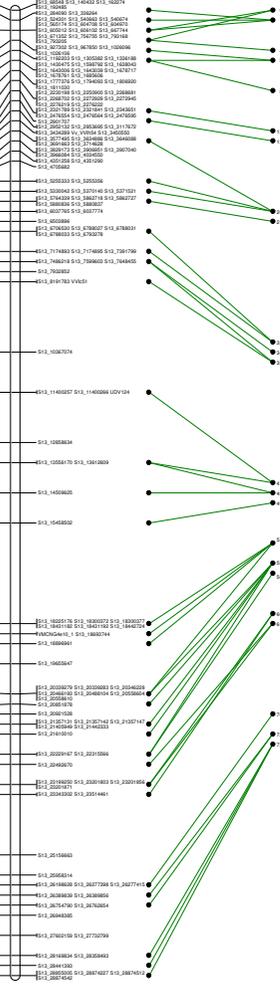




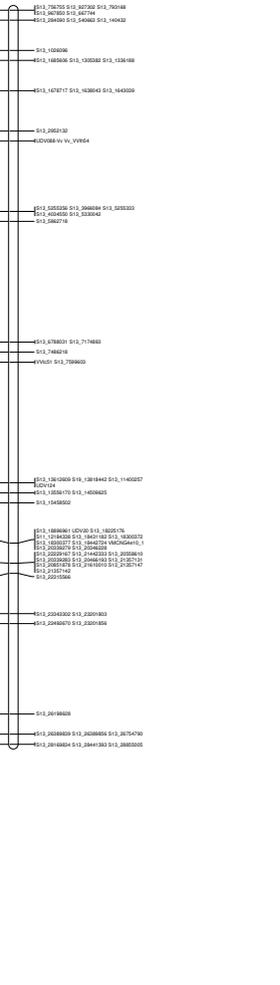
13



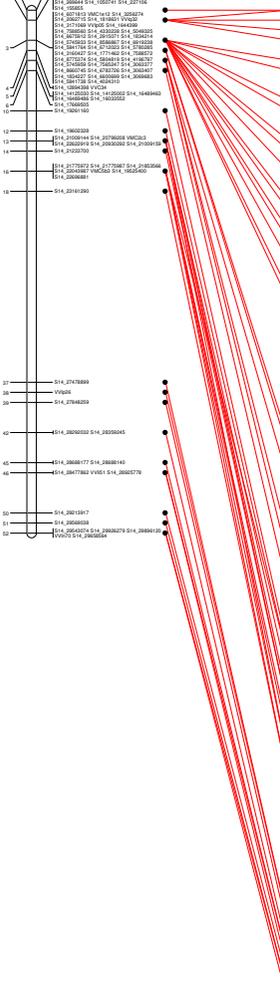
13



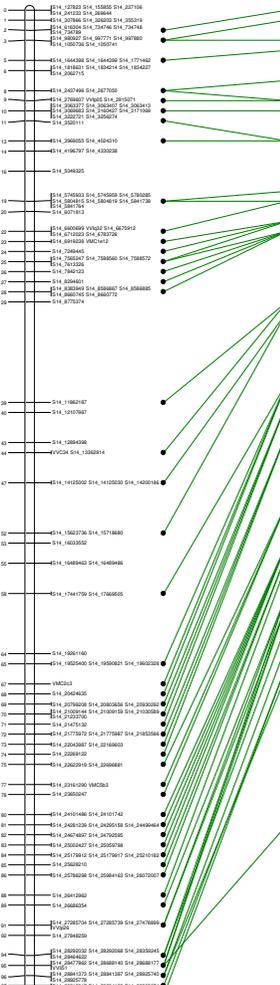
13



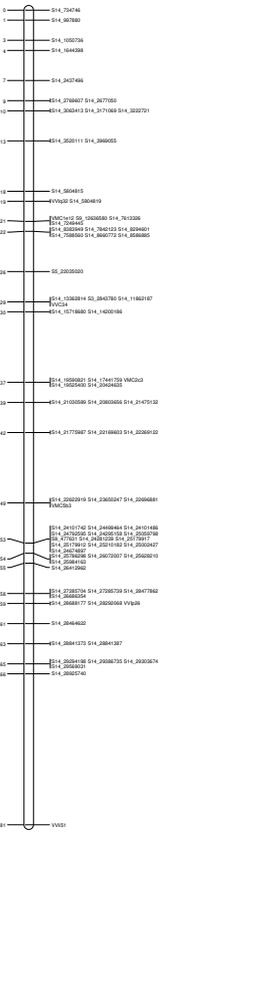
14

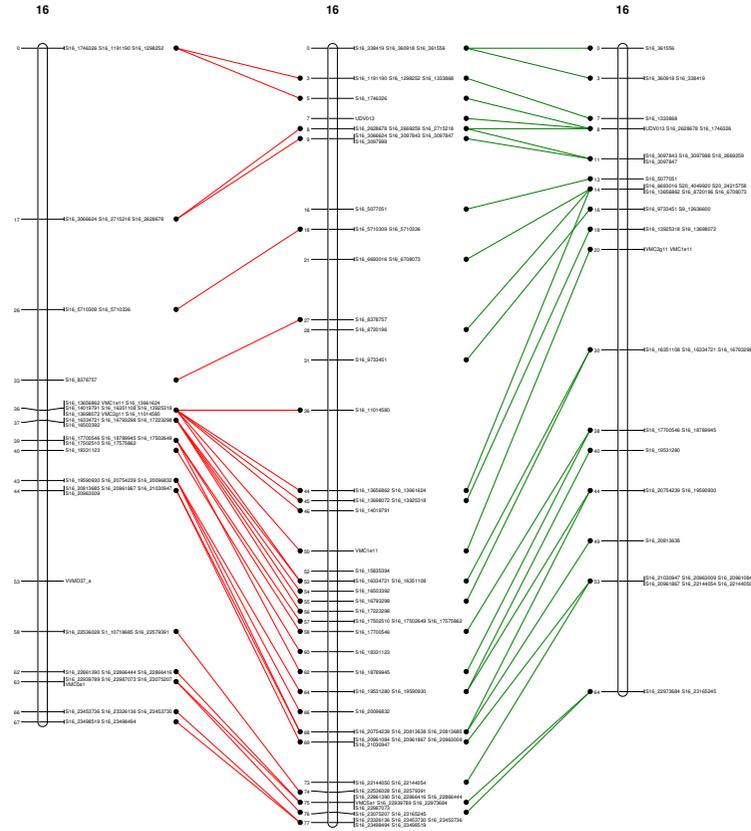
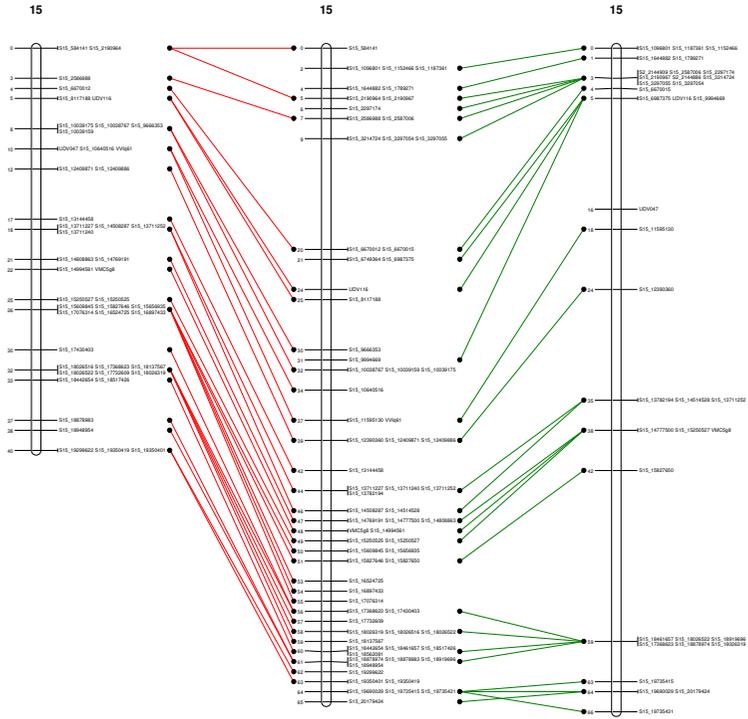


14

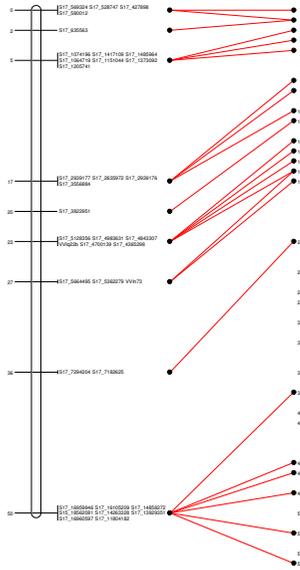


14

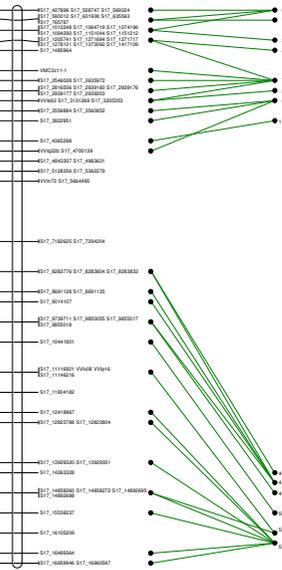




17



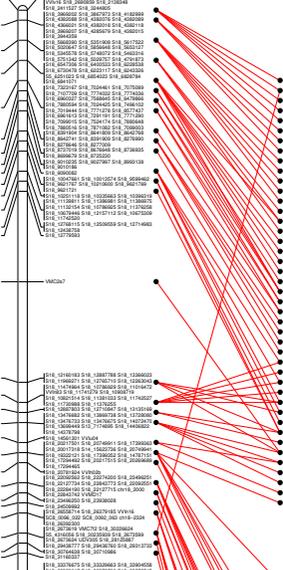
17



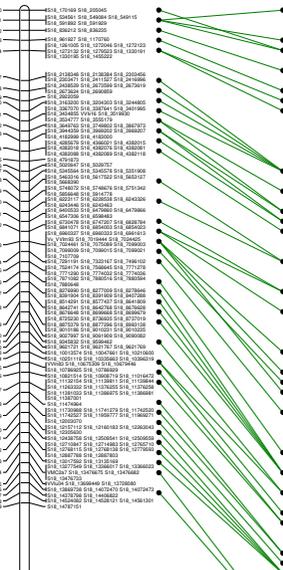
17



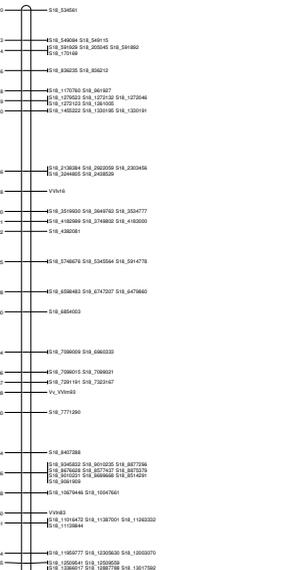
18



18



18



17



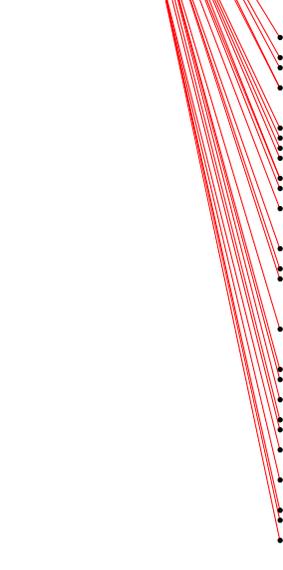
17



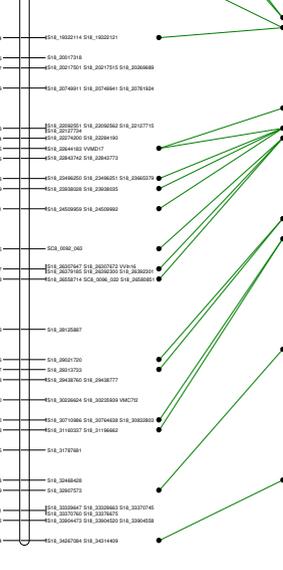
17



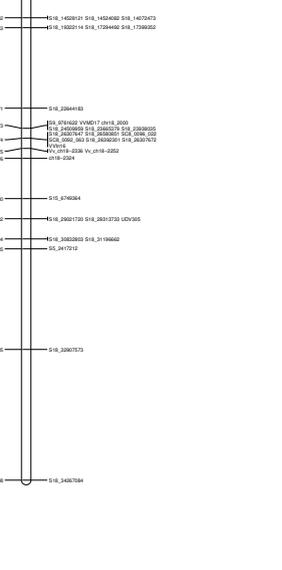
18



18



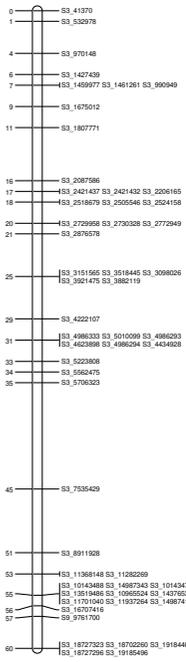
18



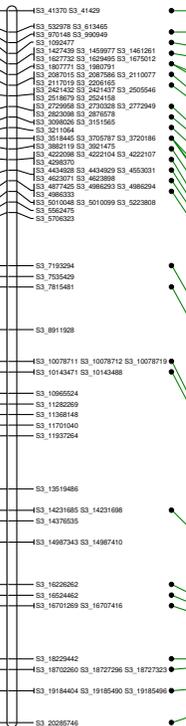
(c)



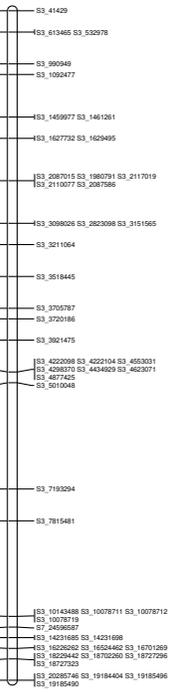
3



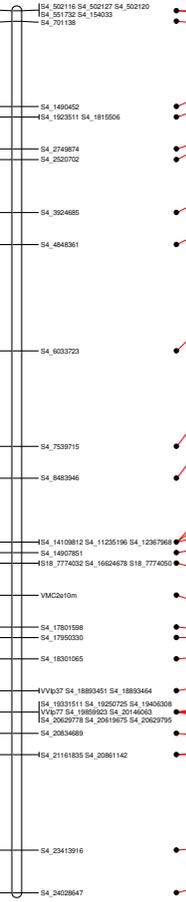
3



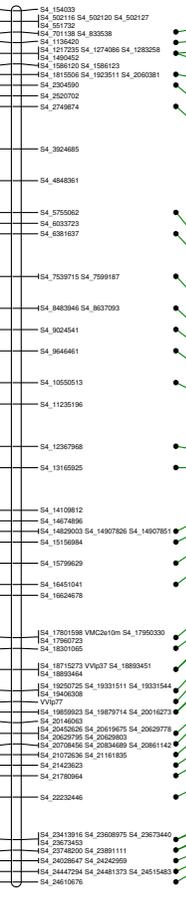
3



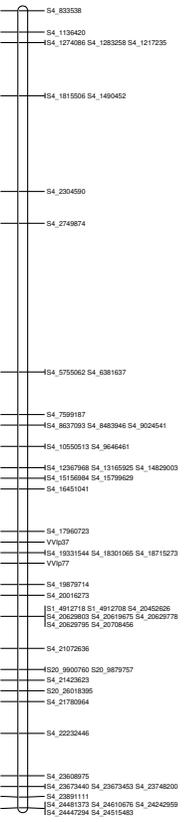
4



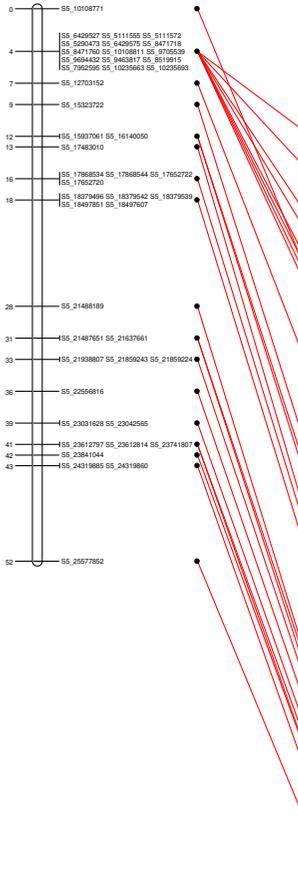
4



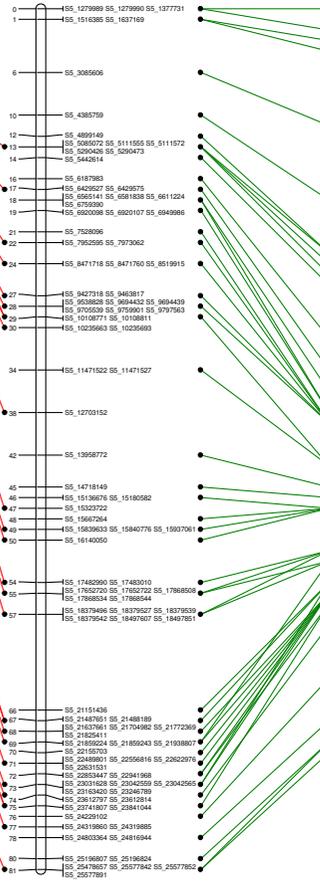
4



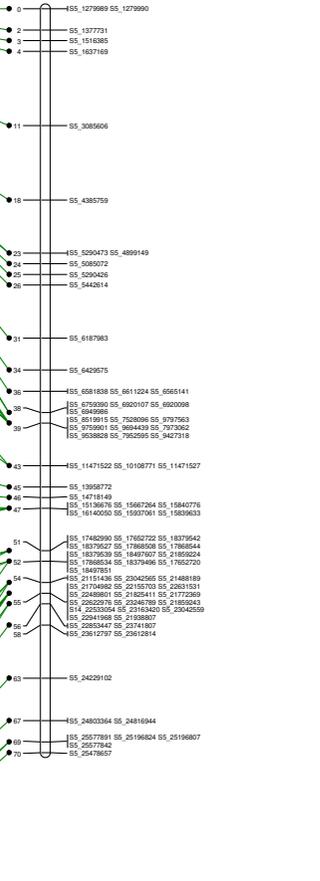
5



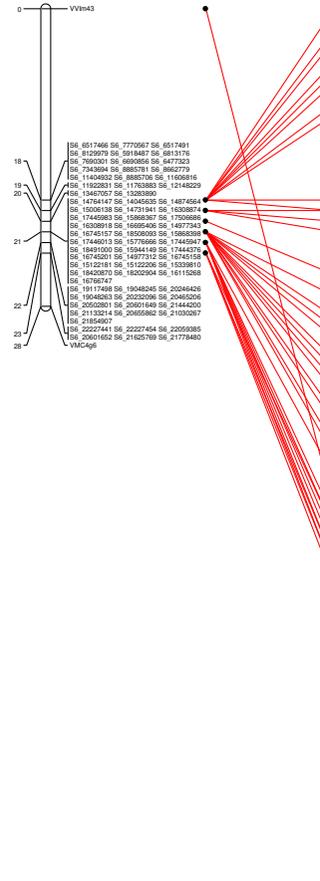
5



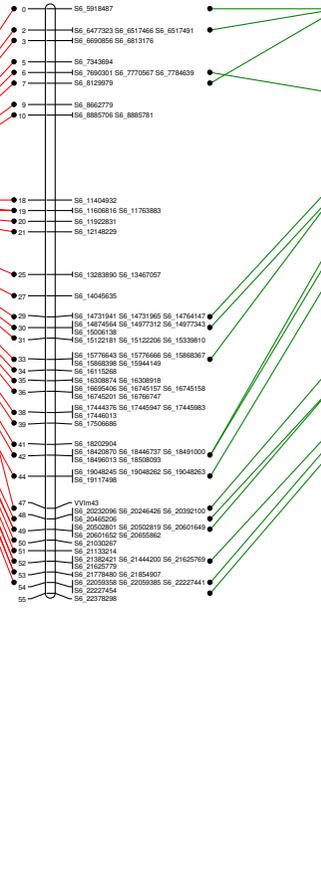
5



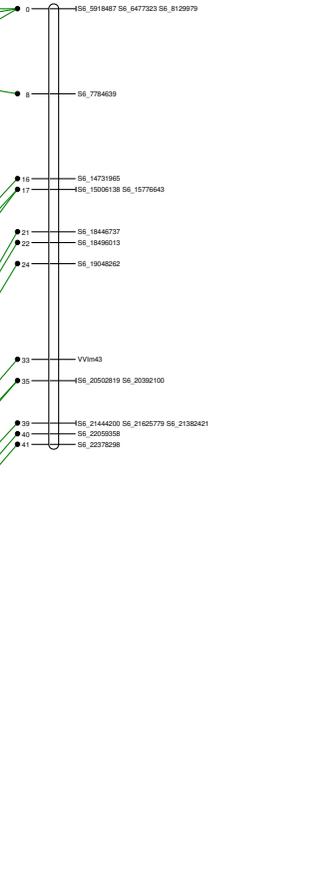
6



6



6



7

0 | 87 1231101 ST 122672 ST 849517
ST 373962

6 | 487 2646337 ST 1751354

15 | 87 2941887

17 | 487 3281173 ST 3285139

19 | 487 3843335 ST 3921097 ST 3738981

21 | 87 3836234
87 4224386 ST 3901052 ST 4007855
87 4048439
87 4688814 ST 4710223 ST 4781056
87 4763406 ST 4810103 ST 4679939
87 4774942
VVV638 ST 5156165

23 | 87 6264647

24 | 87 6328213 ST 6478101 ST 6486963
87 6338213 ST 6411665 ST 6338231

25 | 87 7202204
87 7220123 ST 7216316
87 7379395 ST 7754520

26 | 87 8438587
87 8418480 ST 8477006
87 10471196 ST 10471225 ST 10471176

28 | 87 11861132

29 | 87 1476963 ST 13863251 ST 1444044

30 | 820 7851260
87 12524170 ST 15778098 ST 15776927
87 15776927

34 | 87 16884029

36 | 87 18211191

38 | 487 18709282 ST 18477547

41 | 820 13604376

44 | 487 20923468 ST 20994221
87 21352904
87 21639900
487 22026955 ST 21825645 ST 21906241

50 | 87 22273604 ST 22656951 ST 22619719
87 22497135
87 23200144 ST 23200134
87 23454376
87 23906325

52 | 87 2399648
87 24344333 ST 24174711
87 24431156
87 24696256 ST 24712769 ST 24554624
87 25074433
87 25605407 ST 2586848 ST 2734933
87 25846433 ST 27174879 ST 25946448
87 26838464 ST 26818419
87 27174883
87 27176723

7

0 | 487 234015 ST 236075 ST 236088

1 | 87 396040 ST 562742 ST 571505

2 | 87 446167 ST 479646

3 | 87 103340 ST 103343 ST 111789

4 | 87 122622 ST 123161 ST 123154

5 | 87 1423097 ST 1430460 ST 1455496
ST 1791354

7 | 487 2240002 ST 2254535

8 | 87 2645937

9 | 87 2641887

10 | 87 2648670 ST 2681173

11 | 87 3388139

12 | 87 3736657 ST 3802524 ST 3845830

13 | 87 3870500 ST 3821052 ST 3821097

14 | 87 4037655 ST 4049494 ST 4024900

15 | 87 4263388

16 | 87 4694848 ST 4689814 ST 4710223

17 | 87 4741628 ST 4763406 ST 4773542
87 4810103 ST 4679939
87 5156165
VVV638

20 | 87 6084647 ST 6325226 ST 6338211

21 | 87 6328213 ST 6338231
87 6411665 ST 6478101 ST 6486963

22 | 87 7022024 ST 7024393 ST 7216316

23 | 87 7216316 ST 7220123
87 7379395 ST 7379386

24 | 87 7754520 ST 7754537 ST 7813938

25 | 87 8304757 ST 8435657

27 | 87 9068793

28 | 87 9418480 ST 9477006

29 | 87 10154086

30 | 87 10471196 ST 10471196 ST 10471225

31 | 87 11861132 ST 11861132 ST 11928498

32 | 87 1230396

33 | 87 13863229 ST 13863251

34 | 87 1444044

35 | 87 1476963

36 | 820 1230396

37 | 87 1581132 ST 15776927 ST 15776927

38 | 87 1581132 ST 1581132 ST 1581132

39 | 87 1581132 ST 1581132 ST 1581132

40 | 820 6802377
820 12176368 S20 12176368 S20 7851260
87 1476963

41 | 87 1581132

42 | 87 1581132 ST 1581132 ST 1581132

43 | 87 1581132

44 | 87 1581132

45 | 87 1581132

46 | 87 1581132

47 | 87 1581132

48 | 87 1581132

49 | 87 1581132

50 | 87 1581132

51 | 87 1581132

52 | 87 1581132

53 | 87 1581132

54 | 87 1581132

55 | 87 1581132

56 | 87 1581132

57 | 87 1581132

58 | 87 1581132

59 | 87 1581132

60 | 87 1581132

61 | 87 1581132

62 | 87 1581132

63 | 87 1581132

64 | 87 1581132

65 | 87 1581132

66 | 87 1581132

67 | 87 1581132

68 | 87 1581132

69 | 87 1581132

70 | 87 1581132

71 | 87 1581132

72 | 87 1581132

73 | 87 1581132

74 | 87 1581132

75 | 87 1581132

76 | 87 1581132

77 | 87 1581132

78 | 87 1581132

79 | 87 1581132

80 | 87 1581132

81 | 87 1581132

82 | 87 1581132

83 | 87 1581132

84 | 87 1581132

85 | 87 1581132

86 | 87 1581132

87 | 87 1581132

88 | 87 1581132

89 | 87 1581132

90 | 87 1581132

7

0 | 87 236075 ST 236098 ST 236040

1 | 487 562742 ST 571505

6 | 87 879682 ST 122672 ST 103340
87 4428897 ST 123161 ST 123154
87 1445496 ST 103343 ST 1430460
ST 1791354

7 | 487 2240002 ST 2254535

13 | 87 3248070

15 | 87 3843335 ST 3921173 ST 3385139
87 3870500 ST 3738981
87 3921052

19 | 87 4694906 ST 4810103 ST 477542

21 | 87 562742 ST 571505

22 | 87 6325226 ST 6084647 ST 7024393

23 | 87 7220123 ST 7216316 ST 7216316

24 | 87 7379395 ST 7379386 ST 7379386

25 | 87 7754520 ST 7754537 ST 7379386
ST 8304757

26 | 87 8438587

27 | 87 8418480 ST 8477006

28 | 87 10471196 ST 10471196 ST 10471225

29 | 87 11861132 ST 11861132 ST 11928498

30 | 87 1230396

31 | 87 13863229 ST 13863251

32 | 87 1444044

33 | 87 1476963

34 | 820 7851260
87 12524170 ST 15778098 ST 15776927
87 15776927

35 | 87 16884029

36 | 87 18211191

37 | 487 18709282 ST 18477547

38 | 820 13604376

39 | 487 20923468 ST 20994221
87 21352904
87 21639900
487 22026955 ST 21825645 ST 21906241

40 | 87 22273604 ST 22656951 ST 22619719
87 22497135
87 23200144 ST 23200134
87 23454376
87 23906325

41 | 87 2399648
87 24344333 ST 24174711
87 24431156
87 24696256 ST 24712769 ST 24554624
87 25074433
87 25605407 ST 2586848 ST 2734933
87 25846433 ST 27174879 ST 25946448
87 26838464 ST 26818419
87 27174883
87 27176723

8

0 | 88 48795 ST 103451 ST 117423
88 20220 ST 78363 ST 42562
88 70280 ST 78378 ST 71862
88 219708 ST 107446 ST 2024789
88 4211968 ST 376414 ST 245275
88 4203272 ST 3821268 ST 2742893
88 70280 ST 78363 ST 78363
88 4211968 ST 3423527
88 5465551 ST 3463026 ST 234015
88 5671215

1 | 88 7224270 ST 763504

2 | 88 772523 ST 764866

3 | 88 8778476 ST 774857

4 | 88 906862 ST 906862 ST 906870

5 | 88 970327 ST 963350

6 | 88 9862387 ST 1015304 ST 10159342

7 | 88 1048322

8 | 88 1060269 ST 10602675

9 | 88 10702338 ST 10702336 ST 10800713

10 | 88 1080069

11 | 88 1144100 ST 11627194 ST 11627194

12 | 88 1144108 ST 11528735 ST 11528772

13 | 88 11528735 ST 11627194 ST 11627194

14 | 88 1158951 ST 11627238 ST 11627220

15 | 88 1176516 ST 11765148 ST 11765168

16 | 88 1188132

17 | 88 1217445 ST 12252126 ST 11947036

18 | 88 1196151 ST 1205974

19 | 88 1226561

20 | 88 1254287 ST 12542860 ST 12542839

21 | 88 1268768 ST 1261162 ST 1265060

22 | 88 1264599 ST 1263668 ST 1265047

23 | 88 13018725 ST 13046266 ST 13018679

24 | 88 1327839 ST 13454909 ST 13468566

25 | 88 1346856 ST 13991288

26 | 88 13784374 ST 13948903 ST 13784702

27 | 88 14133706 ST 14136233 ST 14133679

28 | 88 1432530 ST 1428327 ST 14420549

29 | 88 1464796

30 | 88 15083798 ST 15083778 ST 15032173

31 | 88 15247075 ST 15160586 ST 15116268

32 | 88 1502164 ST 1448898

33 | 88 1524966

34 | 88 1559295 ST 1569274 ST 1573720

35 | 88 1602789 ST 1599442 ST 1582309

36 | 88 1618988 ST 16116037 ST 16789155

37 | 88 1678195 ST 16801781

38 | 88 16844268 ST 17047573

39 | 88 1785541 ST 1766479 ST 1756927

40 | 88 1795455 ST 17906468
88 1815889
88 1821665 ST 18204307 ST 18327289

8

0 | 88 48795 ST 103451 ST 117423

1 | 88 20220 ST 78363 ST 42562

2 | 88 70280 ST 78378 ST 71862

3 | 88 219708 ST 107446 ST 2024789

4 | 88 4211968 ST 376414 ST 245275

5 | 88 4203272 ST 3821268 ST 2742893

6 | 88 70280 ST 78363 ST 78363

7 | 88 4211968 ST 3423527

8 | 88 5465551 ST 3463026 ST 234015

9 | 88 5671215

10 | 88 7224270 ST 763504

11 | 88 772523 ST 764866

12 | 88 8778476 ST 774857

13 | 88 906862 ST 906862 ST 906870

14 | 88 970327 ST 963350

15 | 88 9862387 ST 1015304 ST 10159342

16 | 88 1048322

17 | 88 1060269 ST 10602675

18 | 88 10702338 ST 10702336 ST 10800713

19 | 88 1080069

20 | 88 1144100 ST 11627194 ST 11627194

21 | 88 1144108 ST 11528735 ST 11528772

22 | 88 11528735 ST 11627194 ST 11627194

23 | 88 1158951 ST 11627238 ST 11627220

24 | 88 1176516 ST 11765148 ST 11765168

25 | 88 1188132

26 | 88 1217445 ST 12252126 ST 11947036

27 | 88 1196151 ST 1205974

28 | 88 1226561

29 | 88 1254287 ST 12542860 ST 12542839

30 | 88 1268768 ST 1261162 ST 1265060

31 | 88 1264599 ST 1263668 ST 1265047

32 | 88 13018725 ST 13046266 ST 13018679

33 | 88 1327839 ST 13454909 ST 13468566

34 | 88 1346856 ST 13991288

35 | 88 13784374 ST 13948903 ST 13784702

36 | 88 14133706 ST 14136233 ST 14133679

37 | 88 1432530 ST 1428327 ST 14420549

38 | 88 1464796

39 | 88 15083798 ST 15083778 ST 15032173

40 | 88 15247075 ST 15160586 ST 15116268

41 | 88 1502164 ST 1448898

42 | 88 1524966

43 | 88 1559295 ST 1569274 ST 1573720

44 | 88 1602789 ST 1599442 ST 1582309

45 | 88 1618988 ST 16116037 ST 16789155

46 | 88 1678195 ST 16801781

47 | 88 16844268 ST 17047573

48 | 88 1785541 ST 1766479 ST 1756927

49 | 88 1795455 ST 17906468
88 1815889
88 1821665 ST 18204307 ST 18327289

8

0 | 88 48795 ST 103451 ST 117423

1 | 88 20220 ST 78363 ST 42562

2 | 88 70280 ST 78378 ST 71862

3 | 88 219708 ST 107446 ST 2024789

4 | 88 4211968 ST 376414 ST 245275

5 | 88 4203272 ST 3821268 ST 2742893

6 | 88 70280 ST 78363 ST 78363

7 | 88 4211968 ST 3423527

8 | 88 5465551 ST 3463026 ST 234015

9 | 88 5671215

10 | 88 7224270 ST 763504

11 | 88 772523 ST 764866

12 | 88 8778476 ST 774857

13 | 88 906862 ST 906862 ST 906870

14 | 88 970327 ST 963350

15 | 88 9862387 ST 1015304 ST 10159342

16 | 88 1048322

17 | 88 1060269 ST 10602675

18 | 88 10702338 ST 10702336 ST 10800713

19 | 88 1080069

20 | 88 1144100 ST 11627194 ST 11627194

21 | 88 1144108 ST 11528735 ST 11528772

22 | 88 11528735 ST 11627194 ST 11627194

23 | 88 1158951 ST 11627238 ST 11627220

24 | 88 1176516 ST 11765148 ST 11765168

25 | 88 1188132

26 | 88 1217445 ST 12252126 ST 11947036

27 | 88 1196151 ST 1205974

28 | 88 1226561

29 | 88 1254287 ST 12542860 ST 12542839

30 | 88 1268768 ST 1261162 ST 1265060

31 | 88 1264599 ST 1263668 ST 1265047

32 | 88 13018725 ST 13046266 ST 13018679

33 | 88 1327839 ST 13454909 ST 13468566

34 | 88 1346856 ST 13991288

35 | 88 13784374 ST 13948903 ST 13784702

36 | 88 14133706 ST 14136233 ST 14133679

37 | 88 1432530 ST 1428327 ST 14420549

38 | 88 1464796

39 | 88 15083798 ST 15083778 ST 15032173

40 | 88 15247075 ST 15160586 ST 15116268

41 | 88 1502164 ST 1448898

42 | 88 1524966

43 | 88 1559295 ST 1569274 ST 1573720

44 | 88 1602789 ST 1599442 ST 1582309

45 | 88 1618988 ST 16116037 ST 16789155

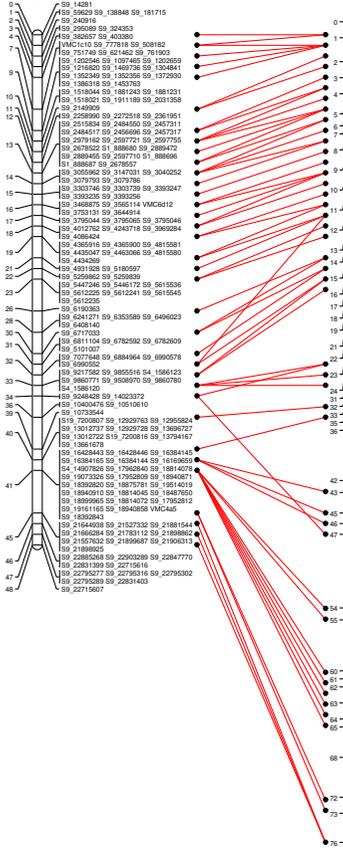
46 | 88 1678195 ST 16801781

47 | 88 16844268 ST 17047573

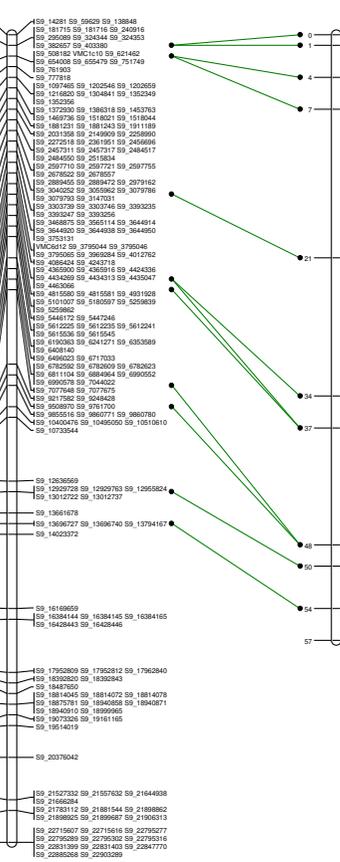
48 | 88 1785541 ST 1766479 ST 1756927

49 | 88 1795455 ST 17906468
88 1815889
88 1821665 ST 18204307 ST 18327289

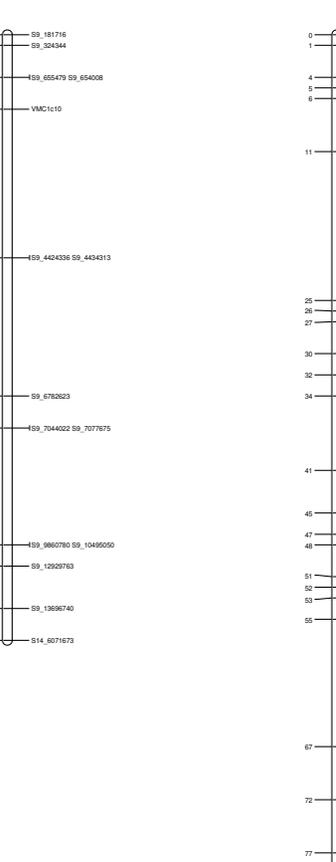
9



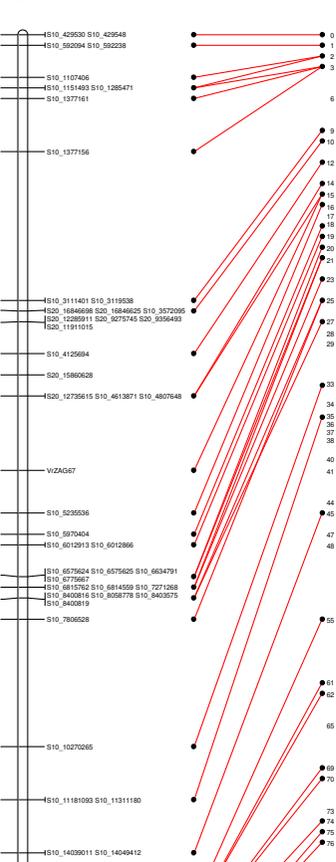
9



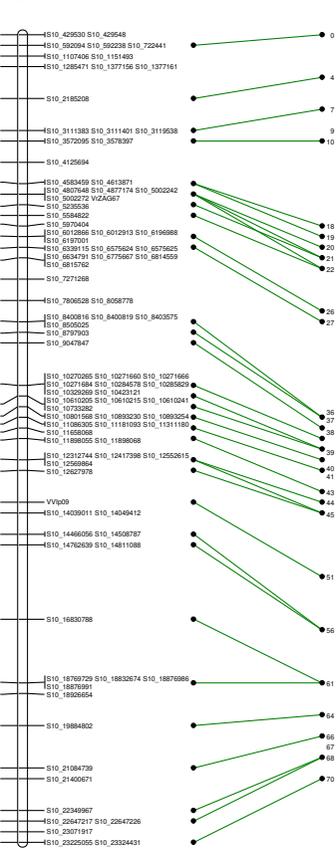
9



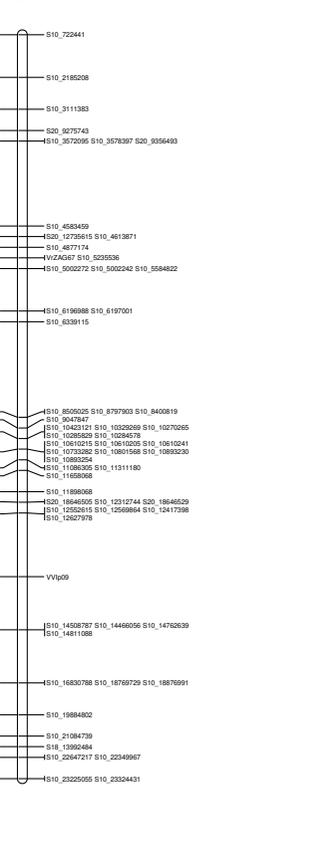
10



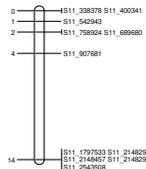
10



10

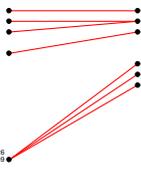


11



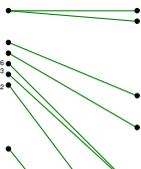
0 -S11_338378 S11_400341
 1 -S11_542943
 2 -S11_127045 S11_089680
 3 -S11_79824 S11_089680
 4 -S11_907681
 7 -S11_907681
 11 -S11_1797533 S11_2148291 S11_2064826
 13 -S11_2148291 S11_2148293 S11_2484827
 19 -S11_2481909 S11_2543508 S11_2567252
 25 -S11_7919461 S11_7800814
 28 -S11_8667647 S11_8688811
 33 -S11_10200783
 39 -S11_12184314
 41 -S11_12546743
 43 -S11_13317036 S11_13317144

11



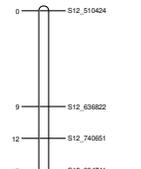
0 -S11_338378 S11_400341 S11_406867
 1 -S11_542943 S11_089680 S11_78924
 2 -S11_907681
 3 -S11_1219561
 4 -S11_1513513 VMC2a12a S11_1593628
 5 -S11_1797533
 6 -S11_2064826 S11_2064826 S11_2064826
 7 -S11_2142729 S11_2148291 S11_2148293
 11 -S11_2481909 S11_2543508 S11_2567252
 13 -S11_4212891 S11_4223746
 17 -S11_1797533 S11_2064826 S11_2066900
 19 -S11_2064826 S11_2142729 S11_2148291 S11_2148297
 23 -S11_2481909 S11_2567252 S11_2543508
 29 -S11_7919461 S11_7800814
 35 -S11_8667647 S11_8688811
 40 -S11_10200783
 46 -S11_12184314
 54 -S11_13317036 S11_13317144
 55 -S11_8155332
 57 -S11_17915303
 58 -S11_17717028

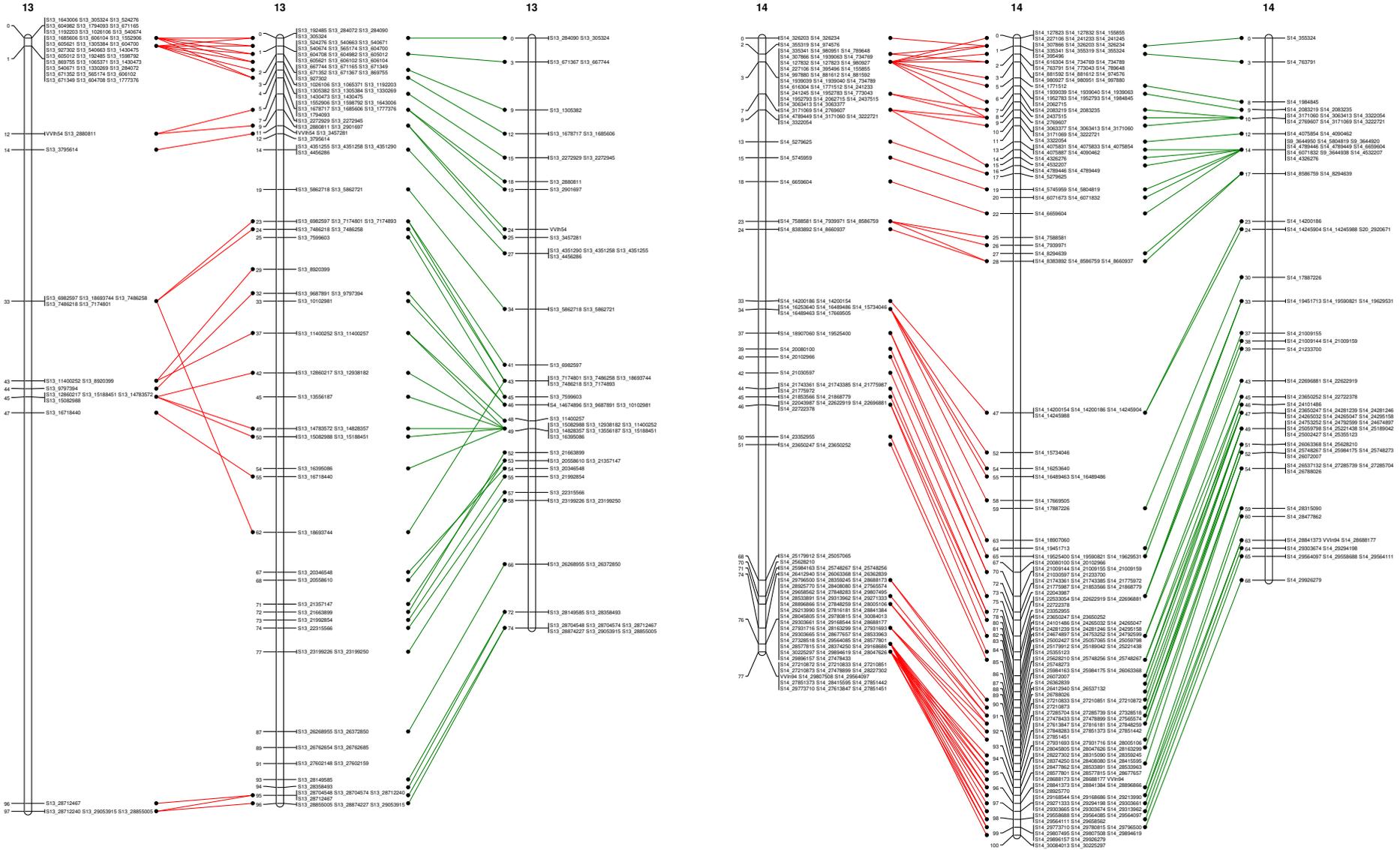
11



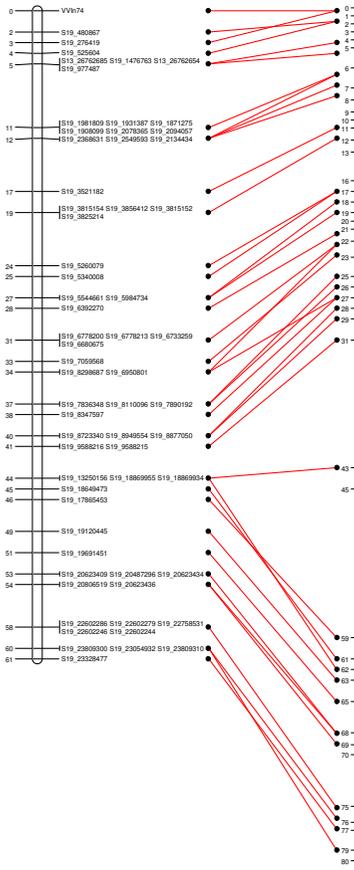
0 -S11_338378 S11_400341
 1 -S11_406867
 8 -S11_1219563
 11 -VMC2a12a S11_1593628 S11_1531351
 17 -S11_1797533 S11_2064826 S11_2066900
 19 -S11_2064826 S11_2142729 S11_2148297
 23 -S11_2481909 S11_2567252 S11_2543508
 29 -S11_3447346 S11_3447343
 35 -S11_3894869 S11_3894867 S11_3882225
 40 -S11_4004895 S11_4101105 S11_4004876
 46 -S11_4021875 S11_4004864 S11_4025728
 54 -S11_4652727
 55 -S11_4178762 S11_5131656 S11_5117155
 57 -S11_5401099 S11_5382907
 58 -S11_5529115 S11_5528833 S11_5546375
 VV14
 S11_8165282 S11_8268782 S11_8165204
 S11_8268786
 S11_8277687 S11_8546309 S11_8488566
 S11_8767081 S11_8491869
 S11_8263048 S11_8488777 S11_10271666
 S11_10271660 S11_10271684
 S11_7092653 S11_8701709 S11_8863435
 S11_8849372 S11_8943934
 S11_7146981 S11_7275665 S11_7190672
 S11_7261678 S11_7261655 S11_7295212
 S11_7146746
 S11_7507070 S11_7527018 S11_7377862
 S11_7527025 S11_7527062 S11_7584163
 S11_7477430 S11_7358070 S11_7358178
 S11_747469
 S11_8262916 S11_8078702 S11_8261918
 S11_8262910
 S11_8763347 S11_8936262 S11_9624711
 S11_9623914 S11_895337 S11_9204801
 S11_8684874 S11_8488760 S11_8550256
 S11_9623903 S11_8937456 S11_9151173
 S11_9628190 S11_9610506 S11_8937070
 S11_9684821 S11_9775034 S11_9730906
 S11_9790488 S11_1190384
 S11_1277825 S11_1477686 S11_1521137
 S11_1370776 VMC43.1 S11_15281321
 S11_1370776 S11_1477686 S11_1521137
 S11_1499787 S11_12152274 S11_15281361
 S11_9790219 S11_9790248 S11_1872000
 S11_1854306 S11_18695289 S11_1869246
 S11_1262666
 S11_2063081 S11_2163240 S11_21613647
 S11_2161361
 S11_2268374 S11_2268369 S11_2268376
 S11_2268177 S11_2268170 S11_2187716
 S11_2268360 S11_2268079 S11_2268363
 S11_2268351 S11_1188965
 S11_2268008 S11_2268488 S11_2373830
 S11_2373826 S11_2347435 S11_2359406
 S11_2348378 S11_2360140 S11_2360129
 S11_2357474 S11_2376525 S11_2345160
 S11_2321737 S11_2341367 S11_23971451
 S11_2393941 S11_2397058 S11_2402982
 S11_2398855
 S11_2363949 S11_24267042

12

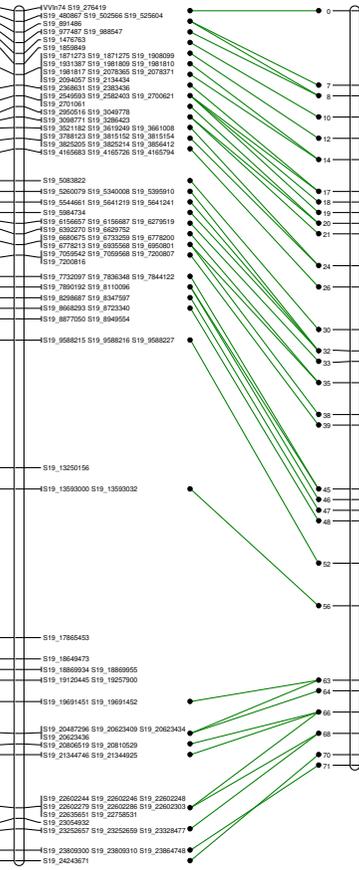




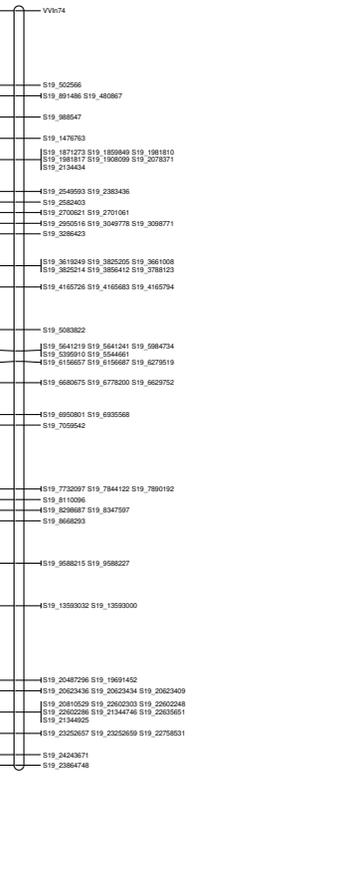
19

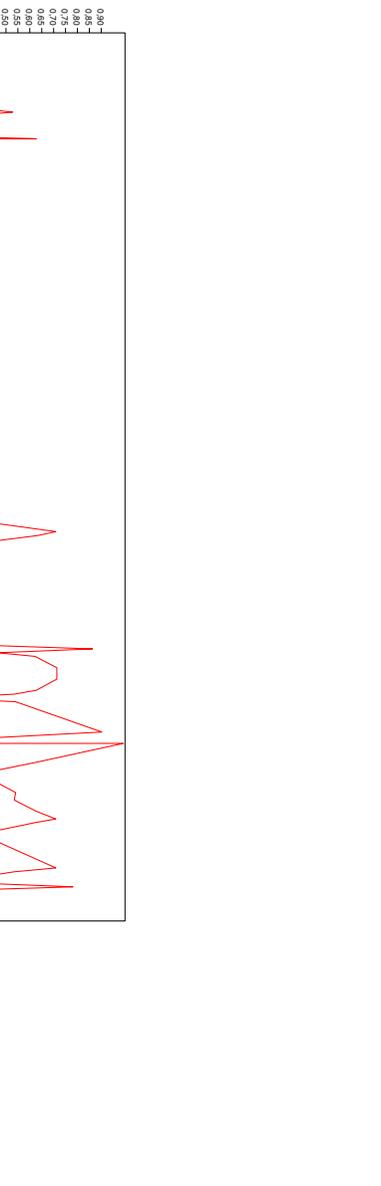
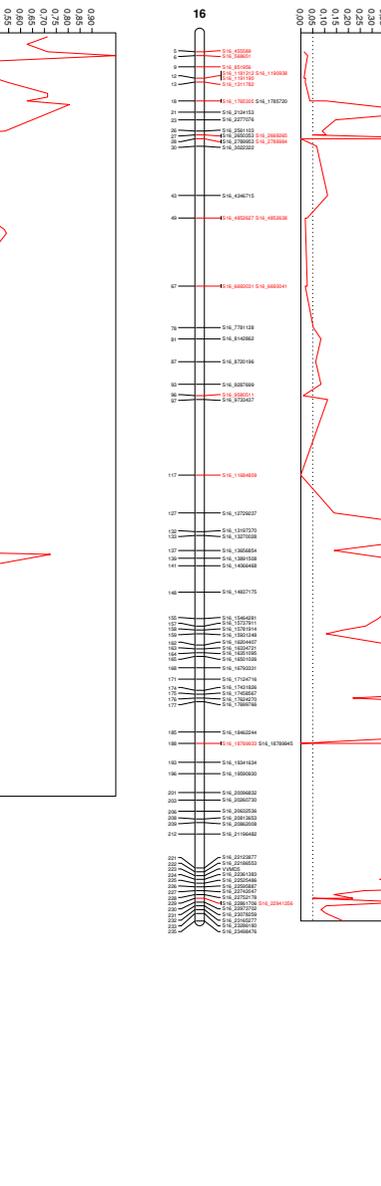
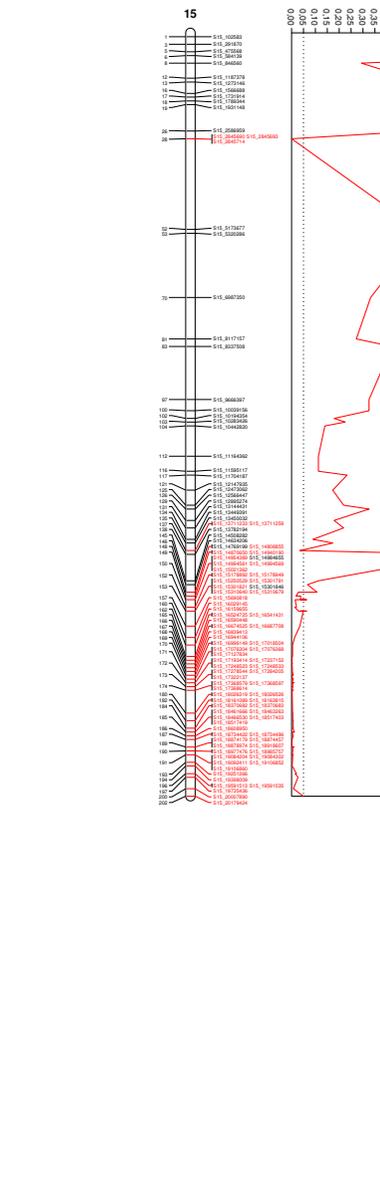
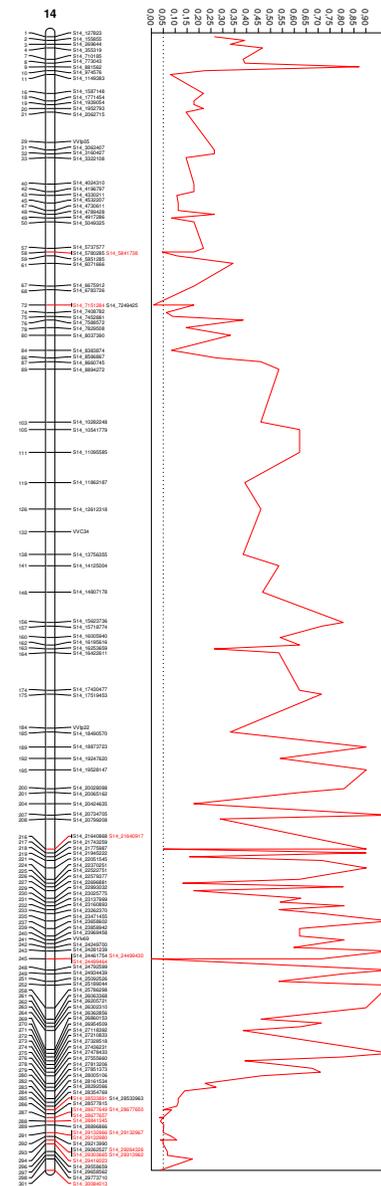
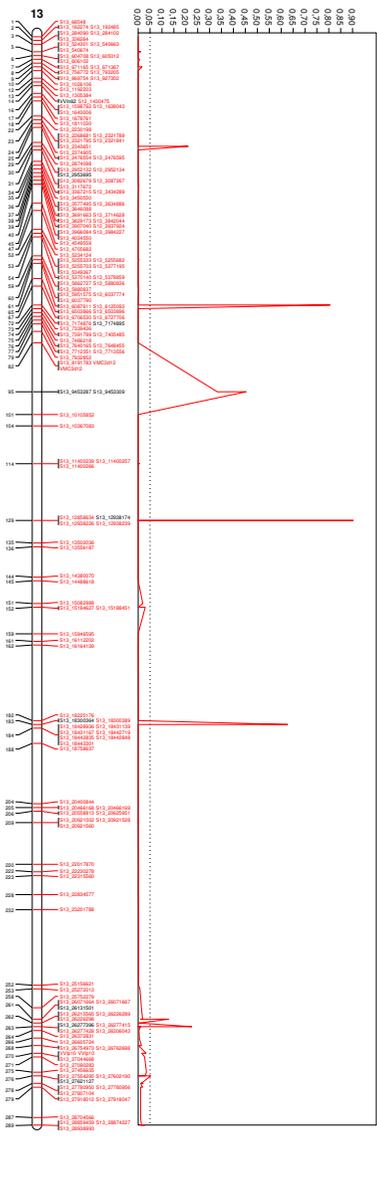


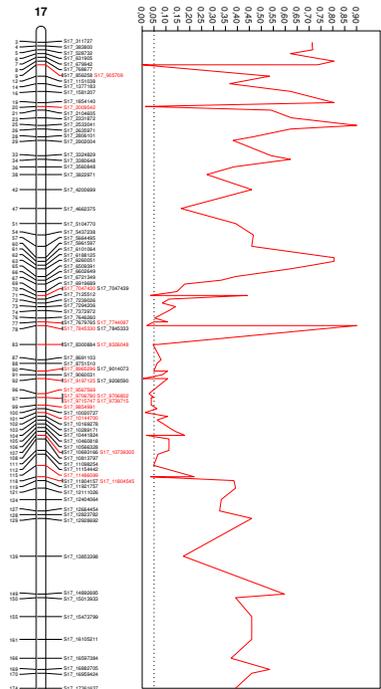
19



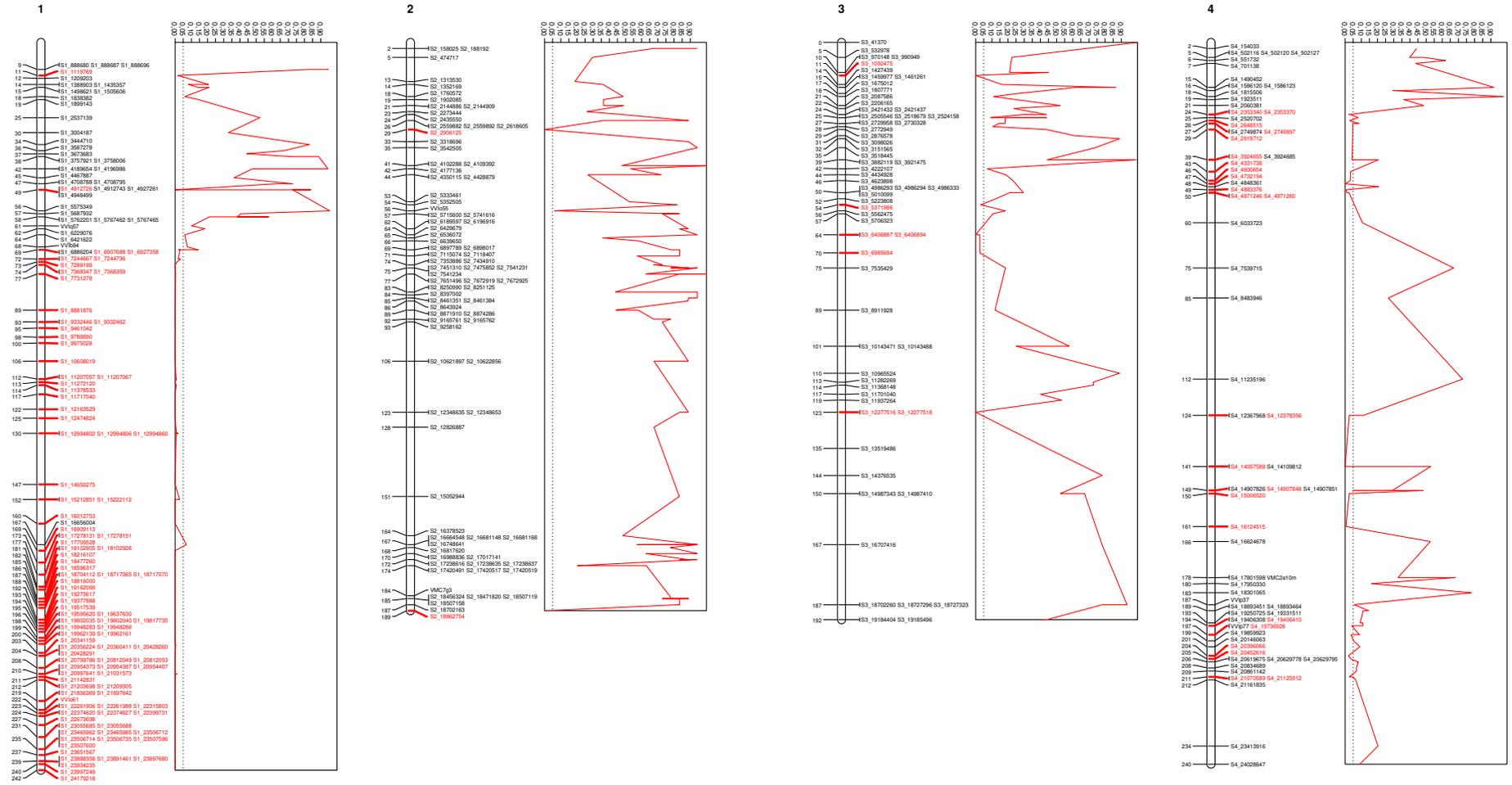
19

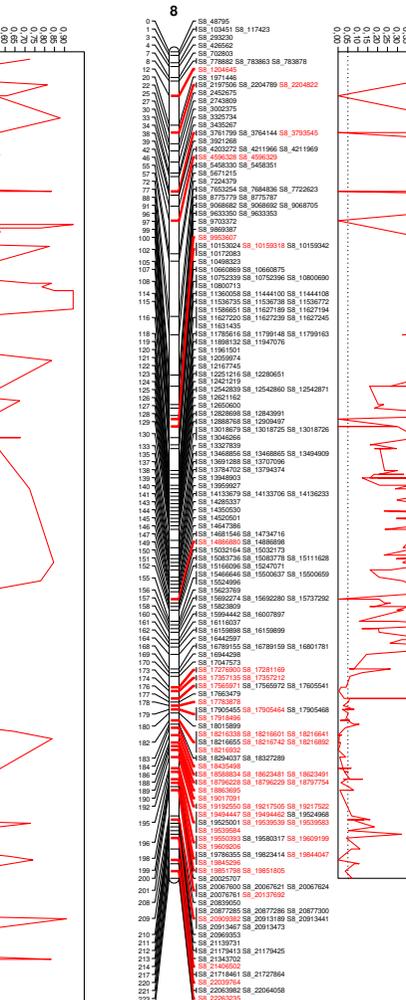
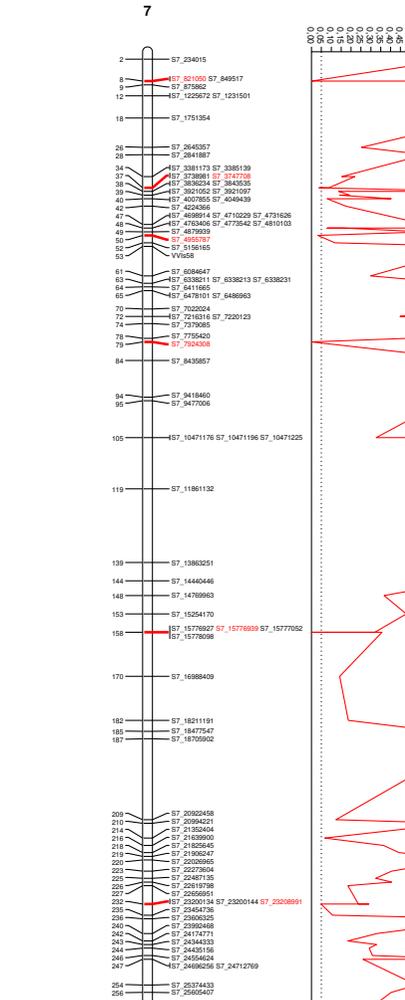
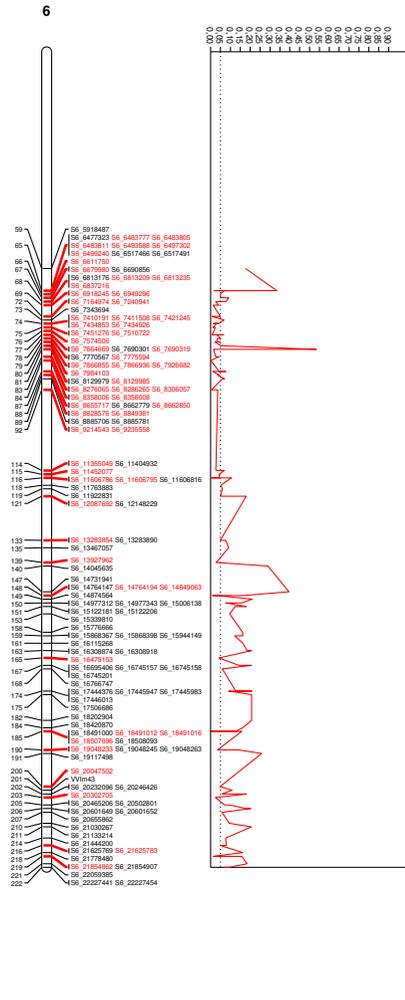
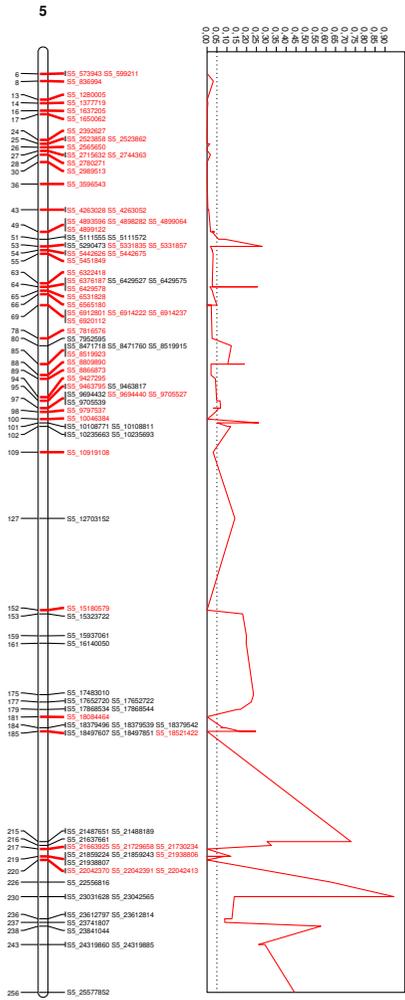


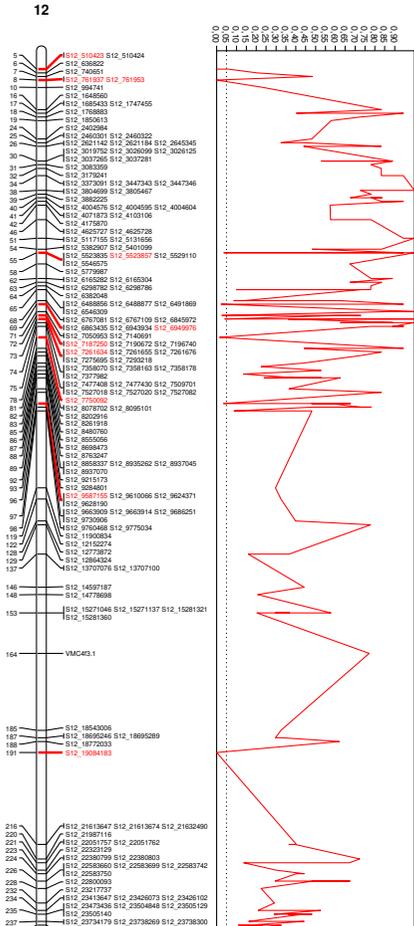
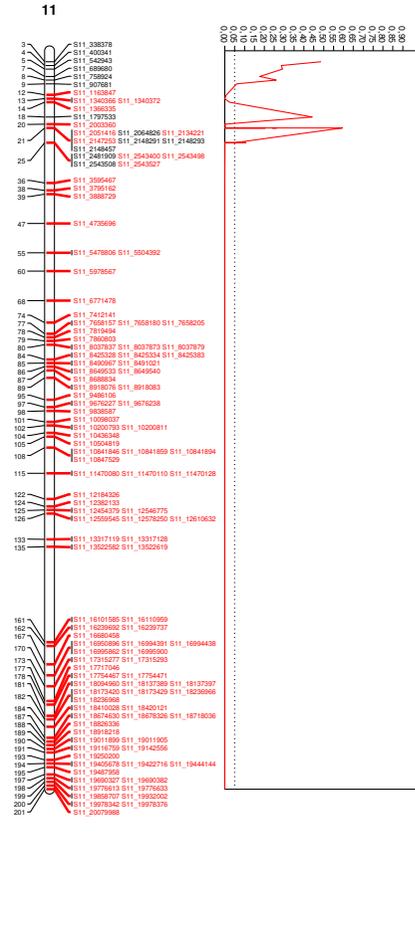
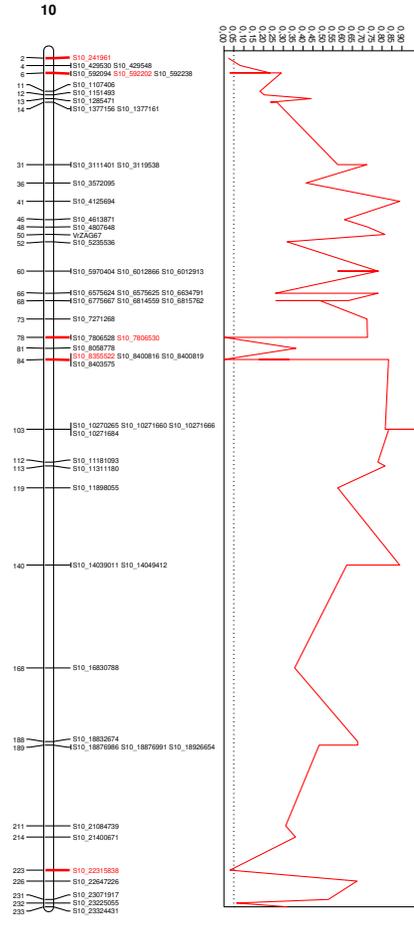
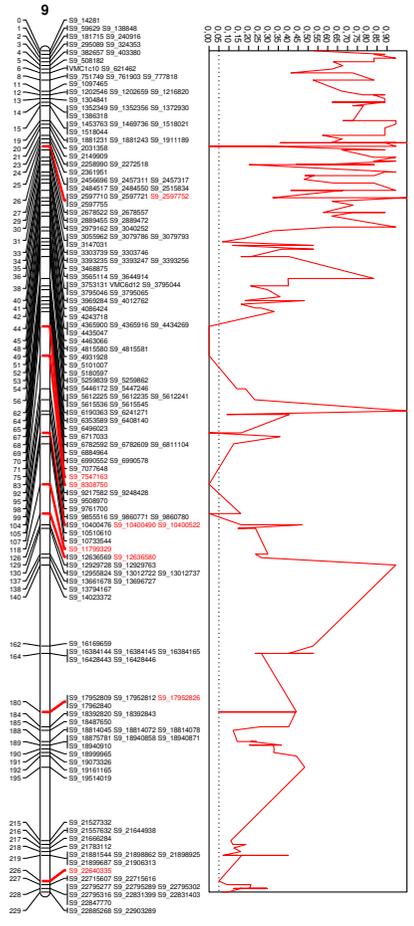




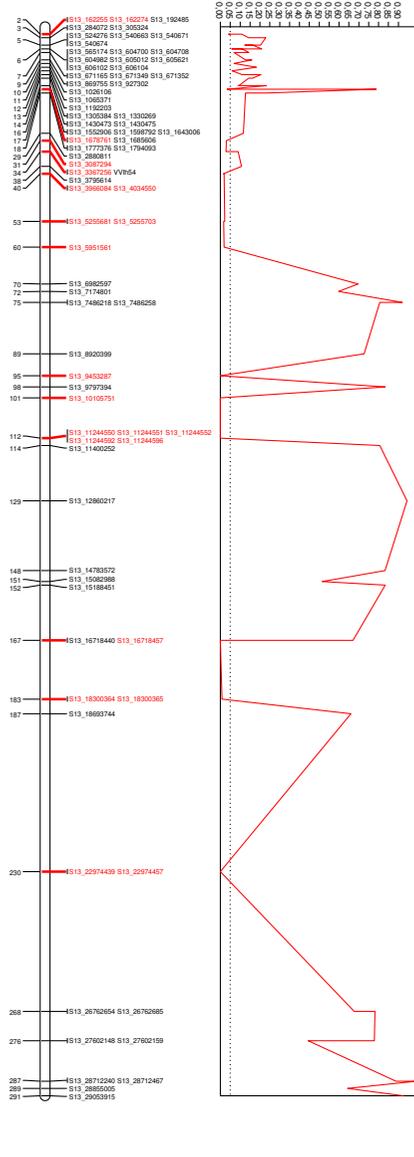
(b)



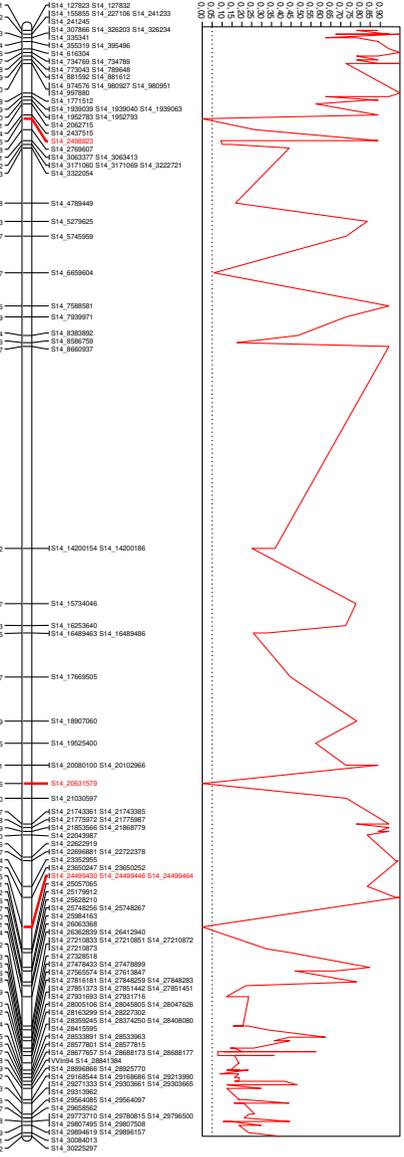




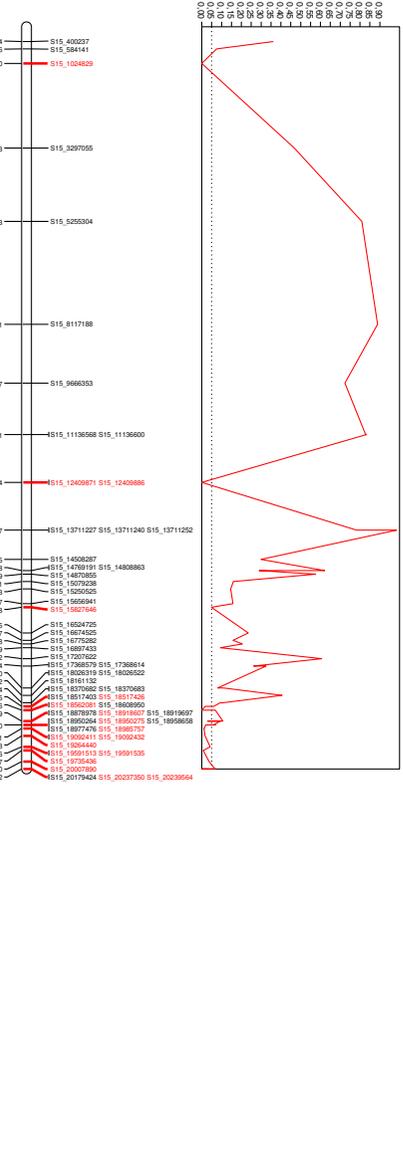
13



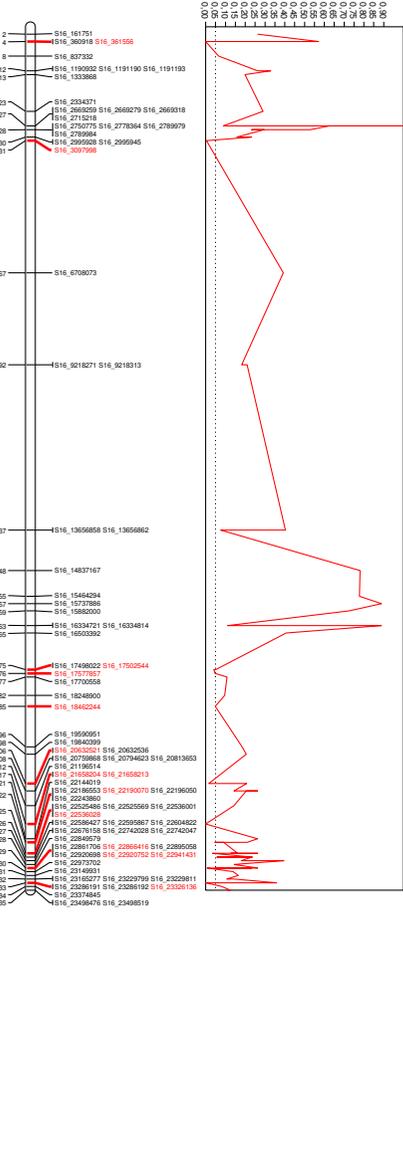
14



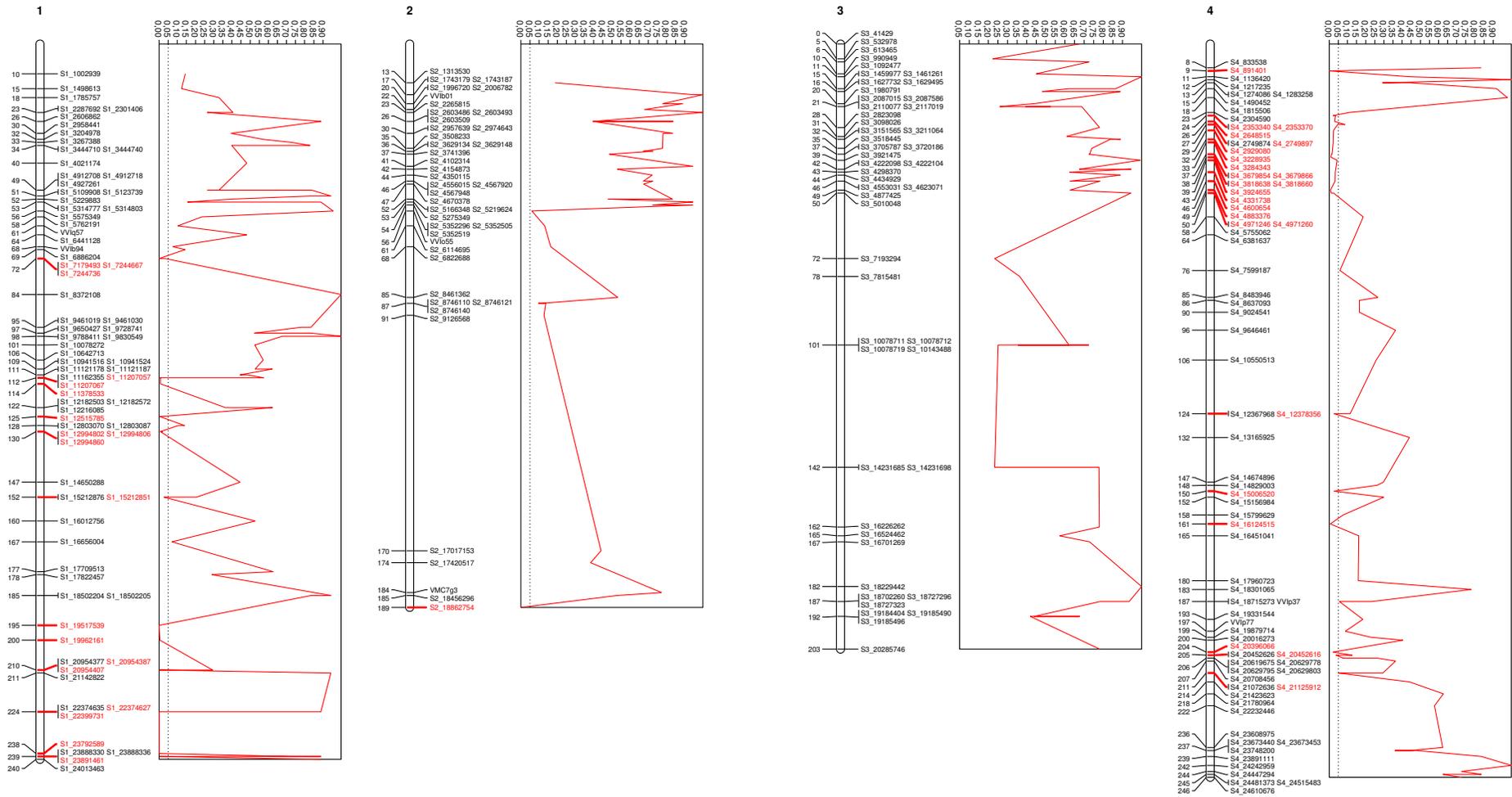
15

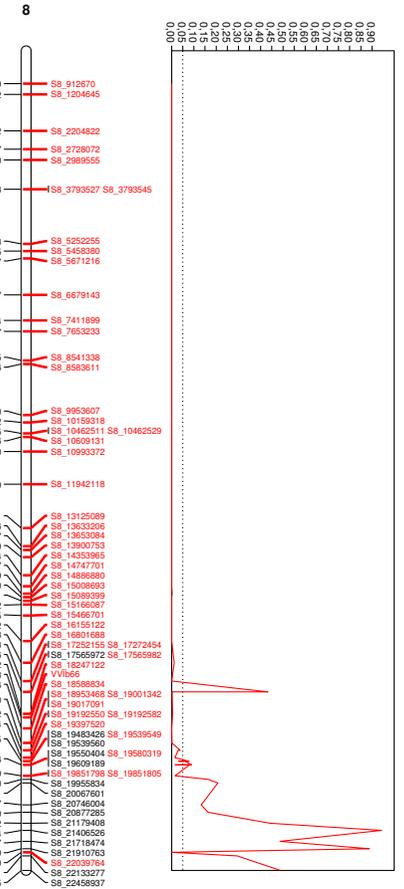
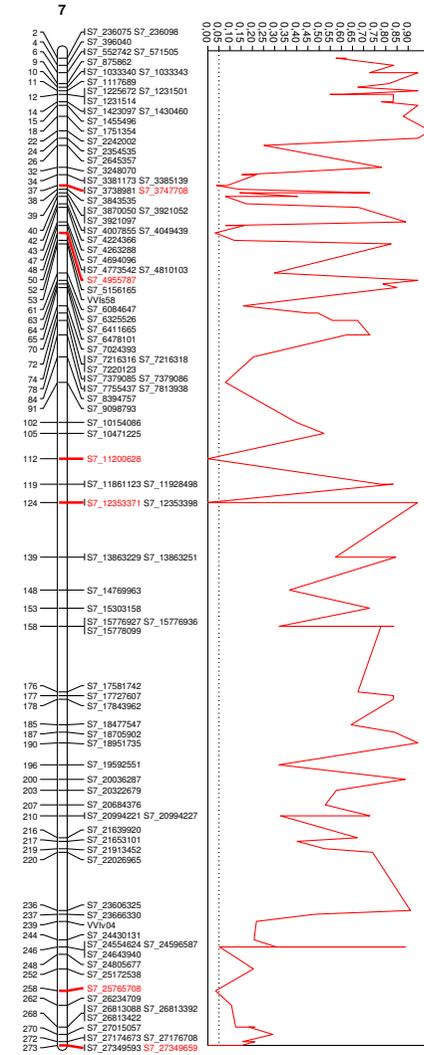
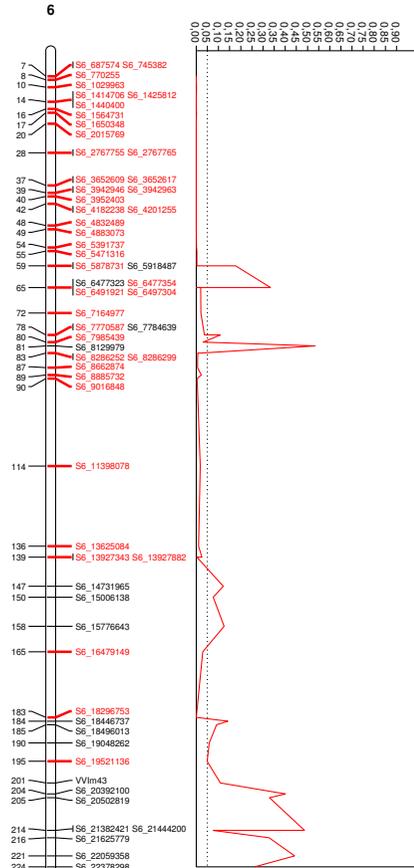
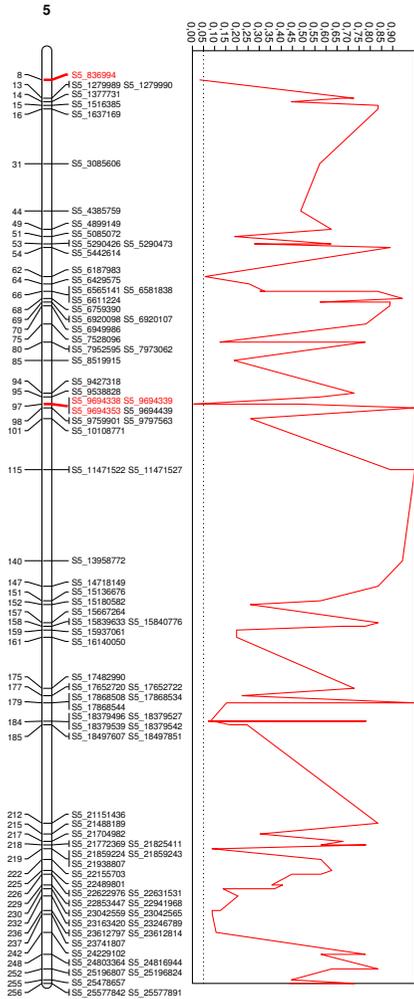


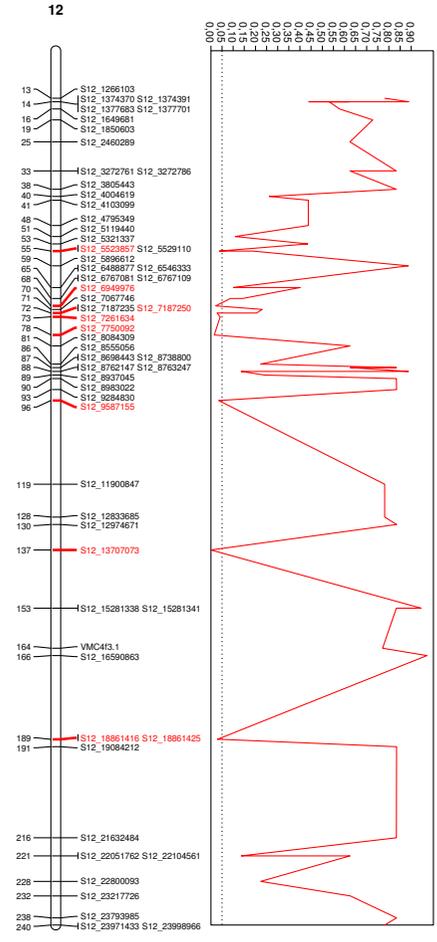
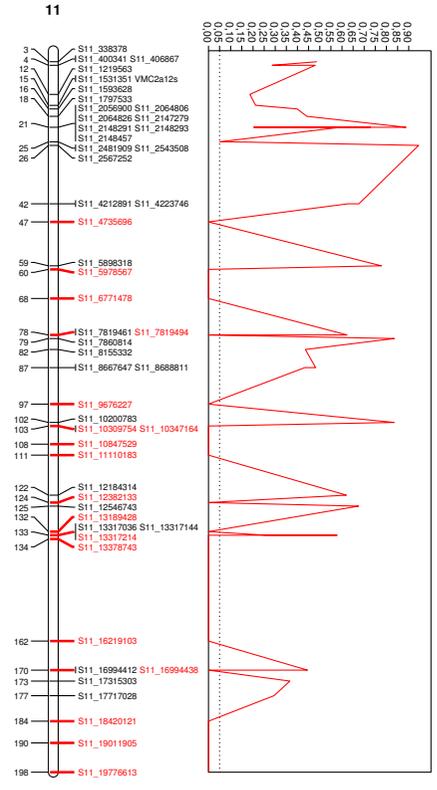
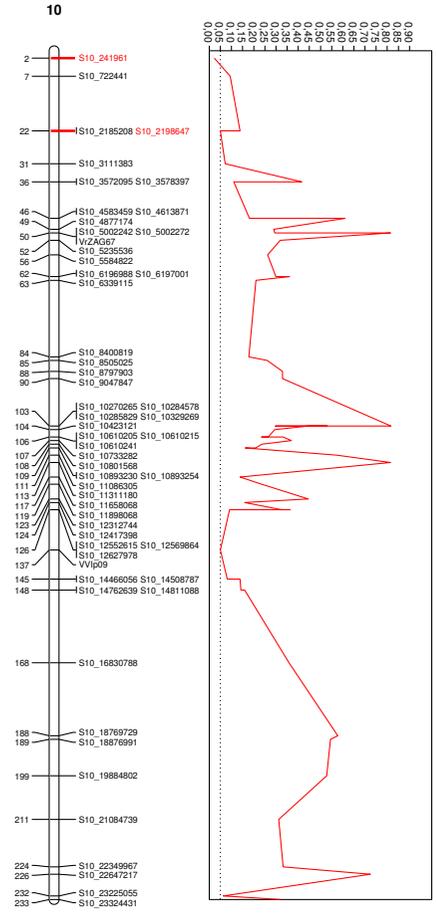
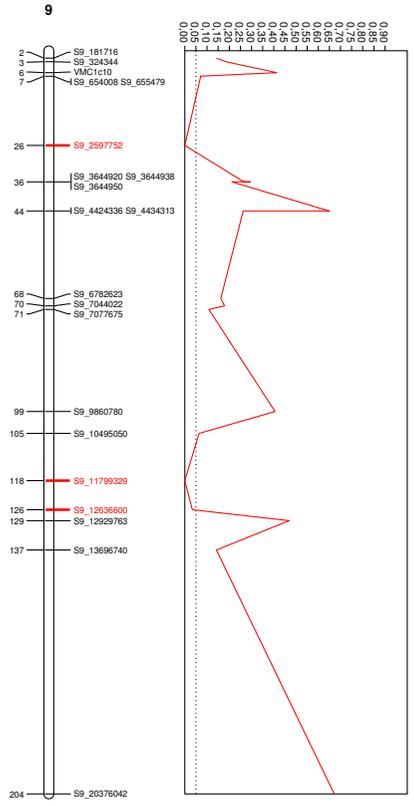
16

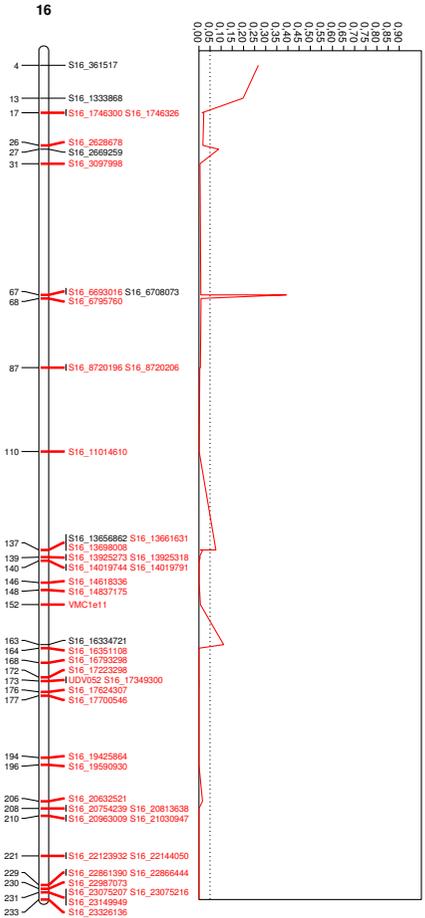
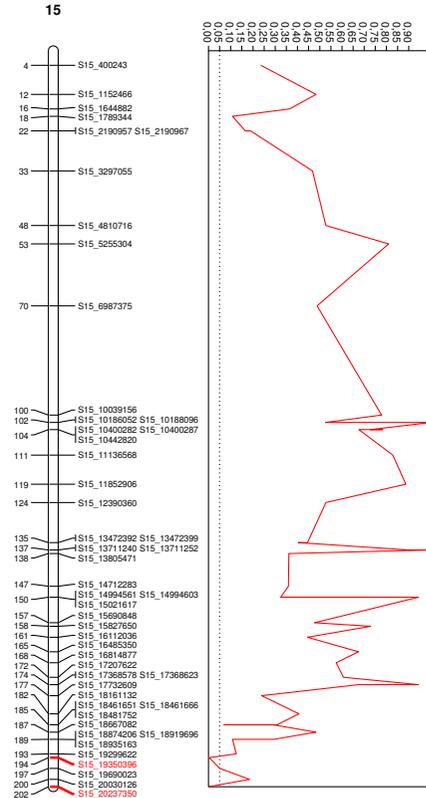
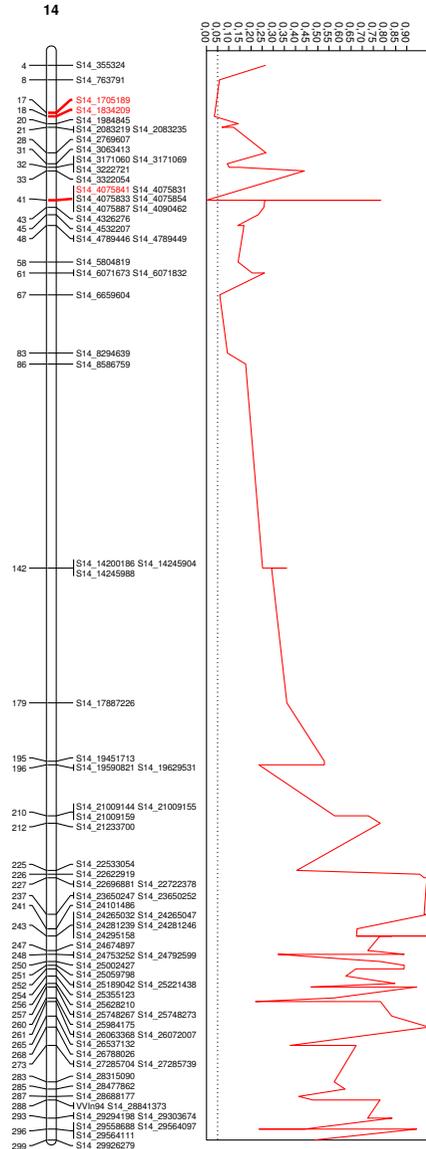
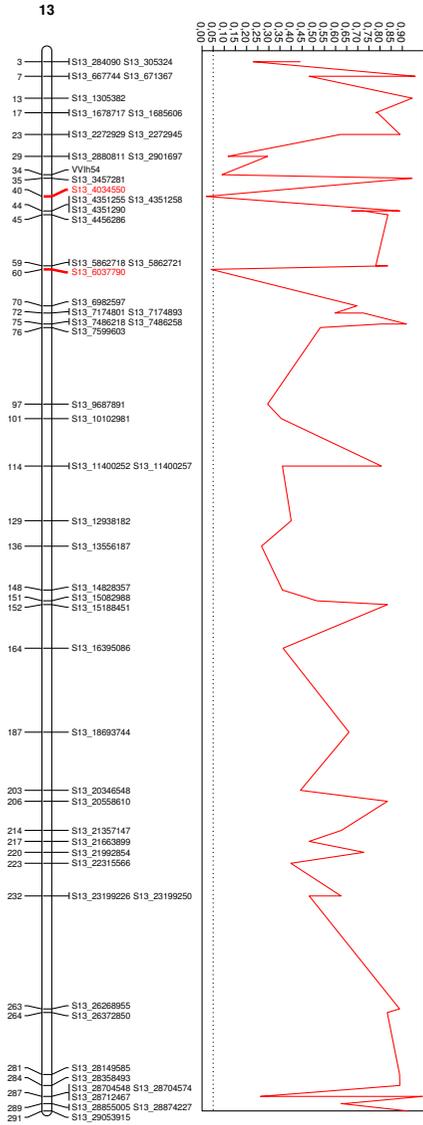


(c)

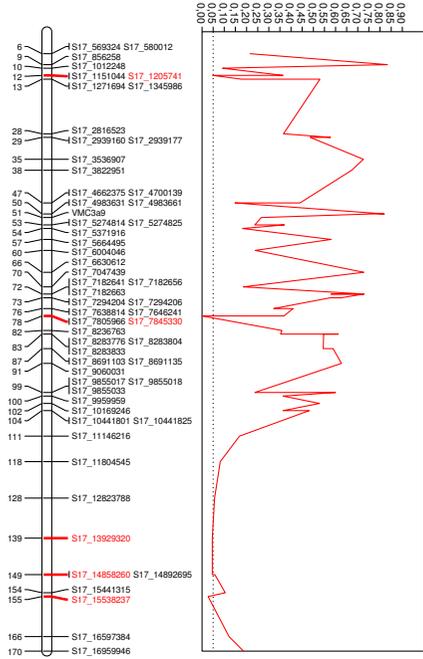




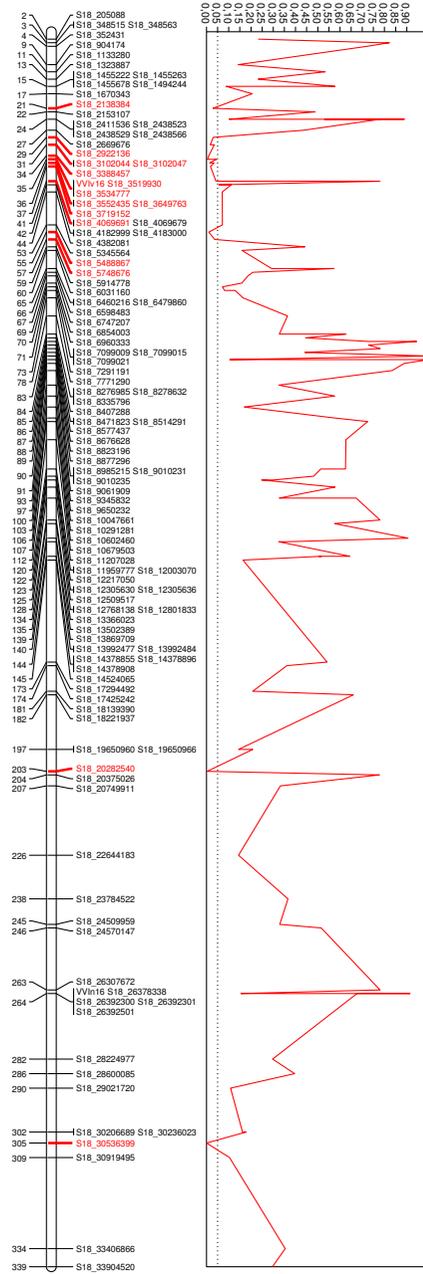




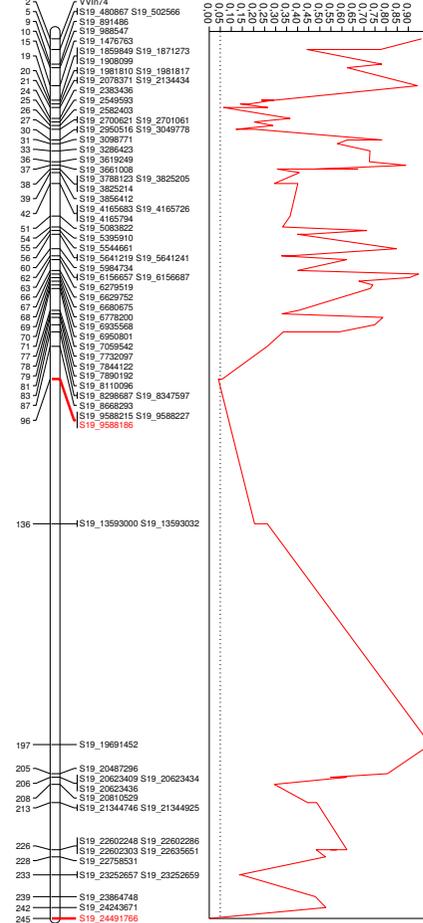
17



18



19



Annexe 2 : Données supplémentaires de l'article « Comparative analysis of *Vitis vinifera* and *Muscadinia rotundifolia* for traits related to phenology and morphology, and genetic control of *M. rotundifolia*'s specific traits »

Table S1: Methods and score scales used to evaluate traits

Figure S1: Traits specific to *M. rotundifolia*.

Figure S2: Ranges and distribution observed in *V. vinifera*, *M. rotundifolia* and in the BC populations.

Table S1: Methods and score scales used to evaluate traits

Organ	Trait	Method	Reference
Phenology	Budburst date (greenhouse)	Quantitative. Heat sums between Feb-15 and budburst	Duchêne <i>et al.</i> , 2010
	Flowering date (greenhouse)	Quantitative. Heat sums between budburst and flowering	Duchêne <i>et al.</i> , 2010
	Veraison date (vineyard)	Quantitative. Heat sums between flowering and veraison	Duchêne <i>et al.</i> , 2010
Young shoot	Aperture of tip	1 = closed 2 = half-open 3 = fully open	OIV001, Anonymous, 2009
	Length of tendrils	1 = tendril below the tip 2 = tendril and tip at the same level 3 = tendril above the tip	From OIV017, Anonymous, 2009
	Distribution of anthocyanin coloration on prostrate hairs of tip	1 = absent 2 = piping 3 = overall	OIV002, Anonymous, 2009
	Intensity of anthocyanin coloration on prostrate hairs of tip	1 = none or very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	OIV003, Anonymous, 2009
	Color of anthocyanin coloration on prostrate hairs of tip	0 = none 1 = brown 2 = red 3 = pink	
	Density of prostrate hairs on tip	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	OIV004, Anonymous, 2009
	Density of erect hairs on tip	1 = none or very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	OIV005, Anonymous, 2009
Mature shoot	Attitude (before tying)	1 = erect 3 = semi-erect 5 = horizontal 7 = semi-drooping 9 = drooping	OIV006, Anonymous, 2009
	Number of consecutive tendrils	1 = 2 or less 2 = 3 or more	OIV016, Anonymous, 2009
	Length of tendrils	Quantitative. Length in cm from the base to the tip of the longest arm of the tendril	From OIV017, Anonymous, 2009
	Tendril complexity	1 = simple tendril 2 = forked tendril	Bouquet, 1980
	Density of prostrate hairs on internodes	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV014, Anonymous, 2009

Organ	Trait	Method	Reference
Mature shoot	Density of erect hairs on internodes	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV012, Anonymous, 2009
	Density of prostrate hairs on nodes	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV013, Anonymous, 2009
	Density of erect hairs on nodes	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV011, Anonymous, 2009
	Color of ventral side of internodes	1 = green 2 = green and red 3 = red 4 = violet	OIV008, Anonymous, 2009
	Color of dorsal side of internodes	1 = green 2 = green and red 3 = red 4 = violet	OIV007, Anonymous, 2009
	Color of ventral side of nodes	1 = green 2 = green and red 3 = red 4 = violet	OIV010, Anonymous, 2009
	Color of dorsal side of nodes	1 = green 2 = green and red 3 = red 4 = violet	OIV009, Anonymous, 2009
	Area of anthocyanin coloration on bud scales	1 = absent 2 = basal 3 = up to $\frac{3}{4}$ of bud scale 4 = almost on the whole bud scale	OIV015-1, Anonymous, 2009
	Intensity of anthocyanin coloration on bud scales	1 = none or very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	OIV015-2, Anonymous, 2009
	Length of internodes at maturity	Quantitative. Length between 2 nodes	From OIV353, Anonymous, 2009
	Diameter of internodes at maturity	Quantitative. Maximum diameter in mm of the center of internode	From OIV354, Anonymous, 2009
Woody shoot	Main color	1 = yellow 2 = brownish 3 = red-violet 4 = grey	OIV103, Anonymous, 2009
	Lenticels	0 = absent 1 = present	From OIV104, Anonymous, 2009; Patel and Olmo, 1955

Organ	Trait	Method	Reference
Woody shoot	Hairs	0 = absent 1 = present	From OIV105 and OIV106, Anonymous, 2009
	Cross section	1 = circular 2 = elliptic 3 = oblate	OIV101, Anonymous, 2009
	Structure of surface	1 = smooth 2 = ribbed 3 = striate	OIV102, Anonymous, 2009
	Wood density	1 = floats 2 = submerged 3 = sinks	Bouquet, 1980
Young leaf	Color of the upper side of blade	1 = green 2 = green with bronze areas 3 = yellow 4 = yellow with bronze area 5 = yellow copper 6 = copper 7 = reddish	From OIV051, Anonymous, 2009
	Density of prostrate hairs between main veins on lower side of blade	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV053, Anonymous, 2009
	Density of erect hairs between main veins on lower side of blade	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV054, Anonymous, 2009
	Density of prostrate hairs on main veins on lower side of blade	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV055, Anonymous, 2009
	Density of erect hairs on main veins on lower side of blade	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV056, Anonymous, 2009
Mature leaf	Color of the upper side of blade	Quantitative. Assessment of the color in the L*a*b system using Minolta Chroma Meter CR-300 series (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)	
	Density of hairs between the main veins on the lower side of blade	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV084 and OIV085, Anonymous, 2009

Organ	Trait	Method	Reference
Mature leaf	Density of hairs on the main veins on the lower side of blade	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV086 and OIV087, Anonymous, 2009
	Density of hairs between the main veins on the upper side of blade	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	
	Density of hairs on the main veins on the upper side of blade	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV088 and OIV089, Anonymous, 2009
	Density of hairs on petiole	0 = none 1 = very low 3 = low 5 = medium 7 = high 9 = very high	From OIV090 and OIV091, Anonymous, 2009
	Area of anthocyanin coloration of main veins on lower side of blade	1 = absent 2 = only at the petiolar point 3 = up to the first bifurcation 4 = up to the second bifurcation 5 = beyond the second bifurcation	OIV071, Anonymous, 2009
	Area of anthocyanin coloration of main veins on upper side of blade	1 = absent 2 = only at the petiolar point 3 = up to the first bifurcation 4 = up to the second bifurcation 5 = beyond the second bifurcation	OIV070, Anonymous, 2009
	Length of petiole	Quantitative. Length in cm	
	Size of blade (greenhouse)	Quantitative. Assessment of the area of the blade in cm ² using ImageJ 1.48v software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)	
	Length of tooth N1	Quantitative. Length in mm of the altitude of the triangle built with the two side of the tooth and its base	Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Width of tooth N1	Quantitative. Length in mm of the base of the tooth	Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Length of tooth N2	Quantitative. Length in mm of the altitude of the triangle built with the two side of the tooth and its base	From OIV612, Anonymous, 2009
	Length between the tooth tip of N2 and the tooth tip of the first secondary vein of N2	Quantitative. Length in cm from tip of the tooth to petiolar point	From OIV617, Anonymous, 2009
	Length of vein N1	Quantitative. Length in cm from tip of the tooth to petiolar point	From OIV601, Anonymous, 2009
Length of vein N2	Quantitative. Length in cm from tip of the tooth to petiolar point	From OIV602, Anonymous, 2009	

Organ	Trait	Method	Reference
Mature leaf	Length of vein N3	Quantitative. Length in cm from tip of the tooth to petiolar point	From OIV603, Anonymous, 2009
	Length of vein N4	Quantitative. Length in cm from tip of the tooth to petiolar point	From OIV604, Anonymous, 2009
	Length petiole sinus to upper lateral leaf sinus	Quantitative. Length in cm	From OIV605, Anonymous, 2009
	Length petiole sinus to lower lateral leaf sinus	Quantitative. Length in cm	From OIV606, Anonymous, 2009
	Angle between N1 and N2 measured at the first ramification	Quantitative. Angle in ° between lines formed between the petiolar point and the first ramification	From OIV607, Anonymous, 2009
	Angle between N2 and N3 measured at the first ramification	Quantitative. Angle in ° between lines formed between the petiolar point and the first ramification	From OIV608, Anonymous, 2009
	Angle between N3 and N4 measured at the first ramification	Quantitative. Angle in ° between lines formed between N4 beginning and the first ramification	From OIV609, Anonymous, 2009
	Sum of the angles between veins	Quantitative. Angle in °	
	Length of petiole compared to length of vein N1	Quantitative. Length ratio	From OIV093, Anonymous, 2009
	Length of tooth N1 compared to length of vein N1	Quantitative. Length ratio	
	Chlorophyll quantity	Quantitative. Assessment of chlorophyll quantity of the leaf using Chlorophyll meter SPAD502-Plus (Konica Minolta, Tokyo, Japan)	
	Fresh weight	Quantitative. Weight in mg of 3 leaf discs of ø20mm from the same leaf	
	Dry weight	Quantitative. Weight in mg of 3 leaf discs of ø20mm from the same leaf after drying in an oven at 100°C for the night	
	Humidity rate	Quantitative. Dry weight / fresh weight ratio	
	Number of lobes	Quantitative	From OIV068, Anonymous, 2009; Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Degree of opening / overlapping of petiole sinus	1 = very wide open 2 = wide open 3 = open 4 = slightly open 5 = closed 6 = slightly overlapped 7 = overlapped 8 = very overlapped 9 = strongly overlapped	From OIV079, Anonymous, 2009; Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Shape of base of petiole sinus	1 = U-shaped 2 = brace-shaped ({} 3 = V-shaped	OIV080, Anonymous, 2009
	Degree of opening / overlapping of upper lateral sinus	0 = absence of sinus 1 = open 2 = closed 3 = slightly overlapped 4 = strongly overlapped	From OIV082, Anonymous, 2009

Organ	Trait	Method	Reference
Mature leaf	Depth of upper lateral sinuses	0 = absence of sinus 1 = very shallow 3 = shallow 5 = medium 7 = deep 9 = very deep	From OIV094, Anonymous, 2009
	Width of blade	Quantitative. Maximum width of blade in cm	
	Length of blade	Quantitative. Maximum length of blade in cm	Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Number of teeth	1 = less than 10 teeth 2 = from 10 to 20 teeth 3 = from 20 to 30 teeth 4 = from 30 to 40 teeth 5 = more than 40 teeth	
	Color of the upper side of blade at maturity	1 = yellow 2 = reddish 3 = red 4 = dark red 5 = red violet	OIV306, Anonymous, 2009
Inflorescence	Insertion of first inflorescence	Quantitative. Number of nodes from the shoot base to the first inflorescence	From OIV152, Anonymous, 2009
	Number of inflorescences per shoot	Quantitative.	From OIV153, Anonymous, 2009
	Number of flowers per inflorescence	1 = from 0 to 50 flowers 2 = from 50 to 100 flowers 3 = from 100 to 150 flowers 4 = from 150 to 200 flowers 5 = from 200 to 250 flowers 6 = from 250 to 300 flowers	
	Concave top of the flower	0 = absent 1 = present	
	Color of inflorescence	1 = light green 2 = green 3 = dark green	
	Color of the flower top	1 = green 2 = red	
	Sexual organs	1 = hermaphrodite 2 = female 3 = male	From OIV151, Anonymous, 2009
	Percentage of berry set	Quantitative. Percentage of berries in relation to number of flowers	From OIV501, Anonymous, 2009
Bunch	Length	Quantitative. Distance in cm from the uppermost to the lowest berry of the primary bunch	From OIV202, Anonymous, 2009
	Width	Quantitative. Maximum distance in cm between the lateral berries of the primary bunch	From OIV203, Anonymous, 2009
	Density	1 = very loose 2 = loose 3 = medium 4 = dense 5 = very dense	OIV204, Anonymous, 2009
	Length of peduncle of primary bunch	Quantitative. Distance in cm from insertion point on the shoot to the first ramification of primary bunch	From OIV206, Anonymous, 2009
	Weight	Quantitative. Weight in g of the whole bunch	From OIV502, Anonymous, 2009

Organ	Trait	Method	Reference
Berry	Length	Quantitative. Length in mm	From OIV220, Anonymous, 2009
	Width	Quantitative. Width in mm	From OIV221, Anonymous, 2009
	Shape	1 = obloid 2 = globose 3 = broad ellipsoid 4 = narrow ellipsoid 5 = cylindrical 6 = obtuse ovoid 7 = ovoid 8 = obovoid 9 = horn shaped 10 = finger shaped	OIV223, Anonymous, 2009
	Color of skin	1 = green yellow 2 = rose 3 = red 4 = grey 5 = dark red violet 6 = blue black 7 = bronze	From OIV225, Anonymous, 2009
	Bloom	0 = absent 1 = present	From OIV227, Anonymous, 2009
	Weight of 10 berries	Quantitative. Weight in g	From OIV503, Anonymous, 2009
	Weight of seeds compared to the weight of berries	Quantitative. Weight ratio	
	Ease of detachment from pedicel	For species comparison: 0 = brush absent 1 = brush present For backcrosses study: 1 = very easy (brush absent) 2 = easy 3 = hard	From OIV240, Anonymous, 2009; Patel and Olmo, 1955
	Length of pedicel	Quantitative. Length in mm	From OIV238, Anonymous, 2009
	Thickness of skin	1 = very thin 3 = thin 5 = medium 7 = thick 9 = very thick	OIV228, Anonymous, 2009; Patel and Olmo, 1955; Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Adhesion of skin to flesh	1 = no adhesion of skin to flesh 2 = adhesion of skin to flesh	Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Adhesion of flesh to seeds	1 = no adhesion of flesh to seeds 2 = adhesion of flesh to seeds	
	Anthocyanin coloration of flesh	0 = absent 1 = present	From OIV231, Anonymous, 2009
	Firmness of flesh	1 = soft 2 = slightly firm 3 = very firm	OIV235, Anonymous, 2009
	Lenticels on the skin	0 = absent 1 = present	Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Juice yield in mL/berry	Quantitative. Ratio of juice yield to the number of berries in mL per berry	

Organ	Trait	Method	Reference
Berry	Juice yield in mL/g	Quantitative. Ratio of juice yield to the weight of berries in mL/g	
	Sugar content of juice	Quantitative. Assessment of juice sugar content in °Brix using Pocket Refractometer Pal-1 (Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan)	From OIV505, Anonymous, 2009
	Juice pH	Quantitative. Assessment of pH of berry juice with pH meter Titroline easy (Schott, Mainz, Germany)	From OIV508, Anonymous, 2009
	Total acid content of juice	Quantitative. Volume of NaOH in mL to add to reach a pH 7 point of the juice diluted by 10. Assessment with pH meter Titroline easy (Schott, Mainz, Germany)	From OIV506, Anonymous, 2009
Seed	Number of seeds per berry	Quantitative. Number of seeds in one berry	
	Length	Quantitative. Length in mm	From OIV242, Anonymous, 2009
	Width	Quantitative. Width in mm	
	Shape	1 = ovoid shaped / pointed 2 = intermediate 3 = oblong shaped / stocky	Patel and Olmo, 1955; Bouquet, 1980
	Transversal ridges on dorsal side of seeds	0 = absent 1 = present	OIV244, Anonymous, 2009
	Chalaza location	1 = in the upper half of the seed 2 = in the middle of the seed 3 = in the lower half of the seed	
Bud	Organization	1 = primary and secondary buds perpendicular 2 = primary and secondary buds parallel	Goffinet <i>et al.</i> , 2001
	Hairiness	1 = sparse flock 2 = dense flock	
	Color of hairs	1 = light brown hair 2 = orange hair	
	Size	1 = small bud 2 = medium bud 3 = big bud	

Figure S1: Traits specific to *M. rotundifolia*. Pictures of specific features of *V. vinifera* and *M. rotundifolia*

Density of prostrate hairs on tip

V. vinifera cv. Chaouch blanc
(V108 = very high)



M. rotundifolia cv. Carlos (V108 = none)



Shoot attitude

V. vinifera cv. Karadjidji (V110 = semi-erect)

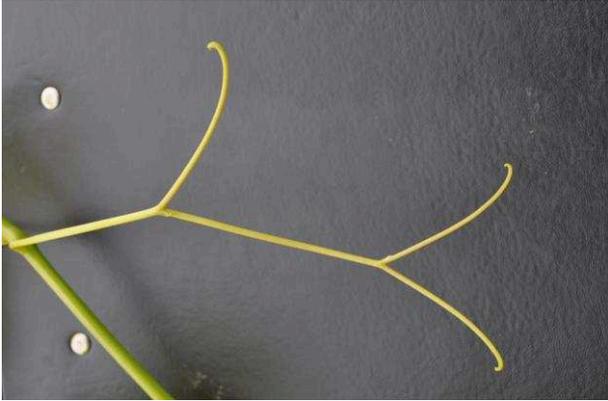


M. rotundifolia cv. Dulcet (V110 = drooping)

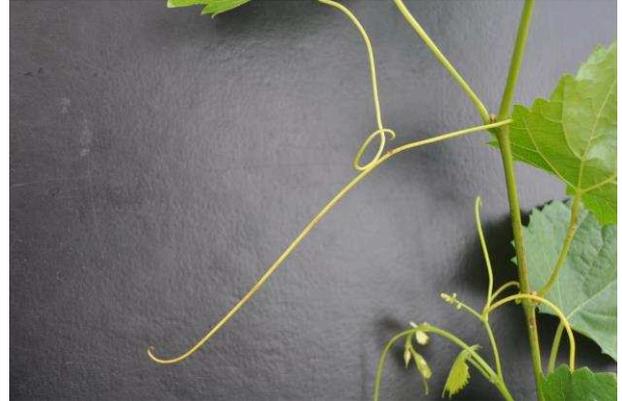


Tendrils complexity

V. vinifera cv. Karadjidji (Tendrils = forked)



M. rotundifolia cv. Carlos (Tendrils = simple)



Colour of ventral side of internodes

V. vinifera cv. Sultanine
(V112 = green and red)



M. rotundifolia cv. Unnamed_1 (V112 = violet)



Colour of dorsal side of internodes

V. vinifera cv. Sultanine (V111 = green)



M. rotundifolia cv. Unnamed_12
(V111 = violet)



Colour of ventral side of nodes

V. vinifera cv. Vidiano (V114 = green and red)



M. rotundifolia cv. Unnamed_14 (V114 = violet)



Colour of dorsal side of nodes

V. vinifera cv. Alba imputotato (V113 = green)



M. rotundifolia cv. Unnamed_14 (V113 = violet)



Main colour of woody shoot

V. vinifera cv. Sultanine (V160 = yellow)



M. rotundifolia cv. Unnamed_1 (V160 = grey)

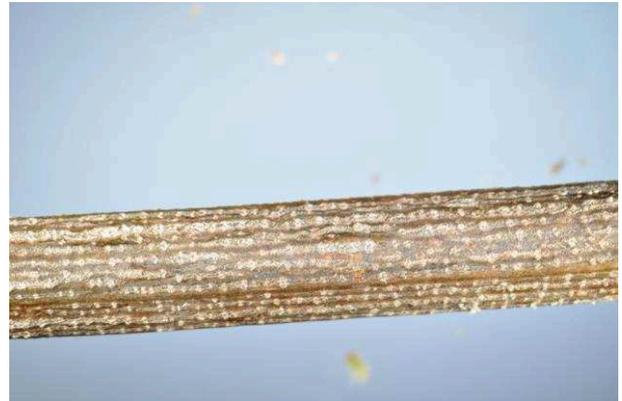


Lenticels on woody shoot

V. vinifera cv. Kremovoi (V161 = absent)



M. rotundifolia cv. Unnamed_17 (V161 = present)



Density of prostrate hairs on main veins on lower side of young leaf blade

V. vinifera cv. Chaouch blanc (V126 = high)



M. rotundifolia cv. Dulcet (V126 = none)



Area of anthocyanin coloration of main veins on lower side of mature leaf blade

V. vinifera cv. Dureza (V133 = at petiolar point)



M. rotundifolia cv. Unnamed_3 (V133 = up to the 2nd bifurcation)



Size of mature leaf blade; Number of lobes; Degree of opening/overlapping of petiole sinus; Number of teeth

V. vinifera cv. Chaouch blanc (Size = 294 cm²; V130 = 5; V141 = overlapped; Teeth = 20 - 40)



M. rotundifolia cv. Unnamed_7 (Size = 30 cm²; V130 = 1; V141 = wide open; Teeth = 10 - 20)



Concave top of the flower

V. vinifera cv. Syrah (Top = present)



M. rotundifolia cv. Regale (Top = absent)



Colour of berry skin

V. vinifera cv. Muscat (Colour = green yellow)



M. rotundifolia cv. Carlos (Colour = bronze)



Bloom on berry skin; Lenticels on berry skin

V. vinifera cv. Rannii (Bloom = present;
Lent = absent)



M. rotundifolia cv. Regale (Bloom = absent; Lent = present)



Ease of detachment of berry from pedicel

V. vinifera cv. Grenache
(Detach = brush present)



M. rotundifolia cv. Yuga x Carlos
(Detach = brush absent)



Shape of seed; Transversal ridges on dorsal side of seed

V. vinifera cv. Rannii (Shape = ovoid;
Ridge = absent)



M. rotundifolia cv. Unnamed (Shape = oblong;
Ridge = present)



Bud hairiness; Colour of bud hairs

V. vinifera cv. Carignan (Bhair = dense flock; Bcol = light brown)



M. rotundifolia cv. Unnamed_1
(Bhair = sparse flock; Bcol = orange)



Size of bud

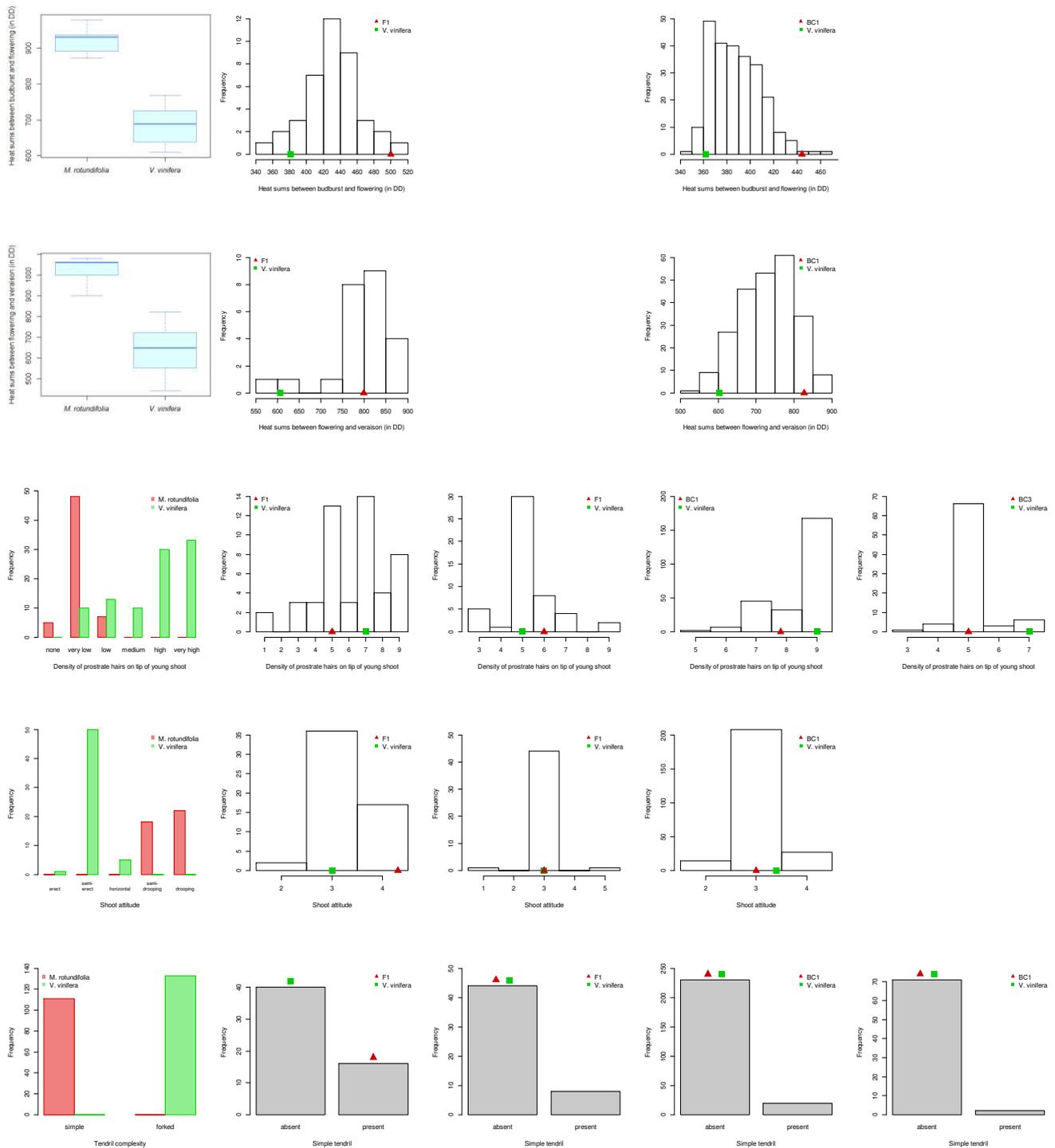
V. vinifera cv. Syrah (Bsize = big)

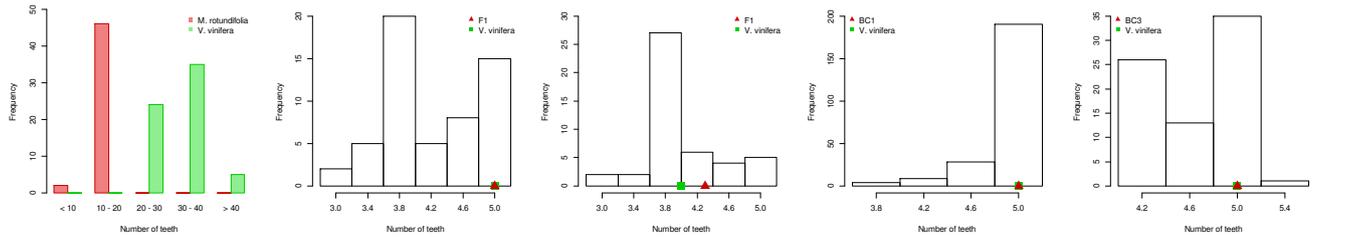
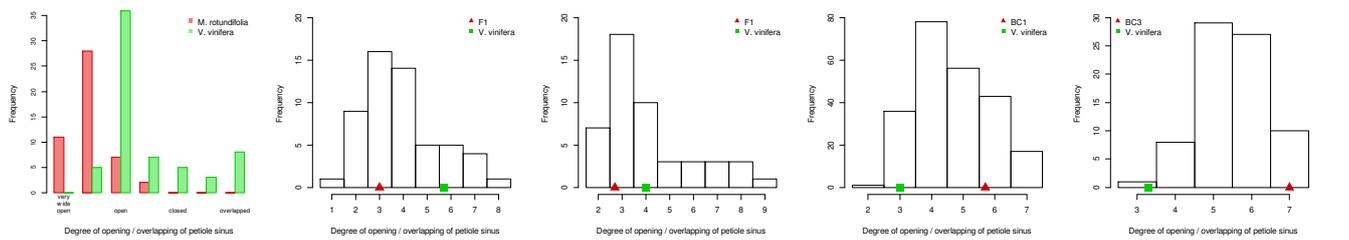
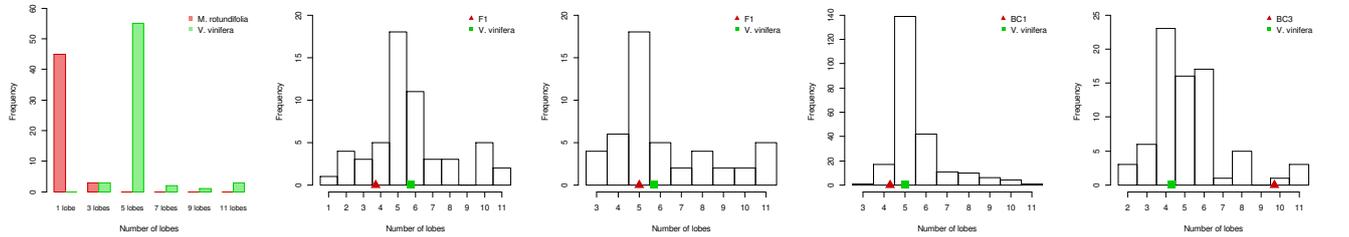
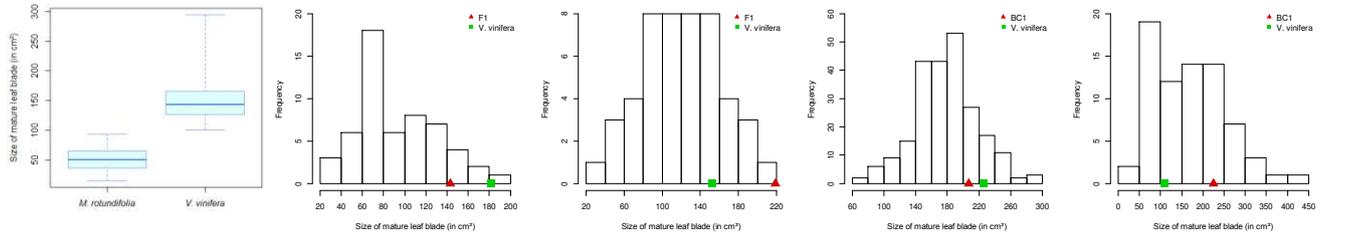
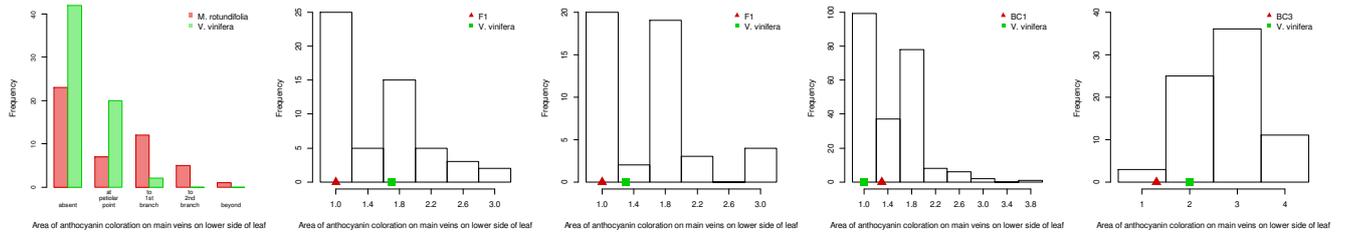
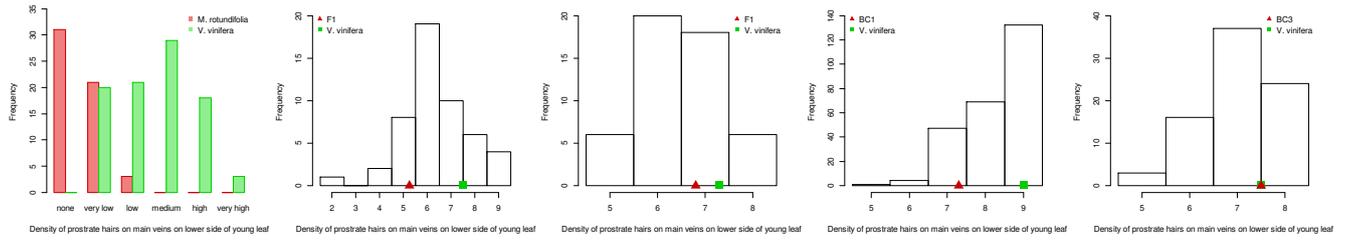


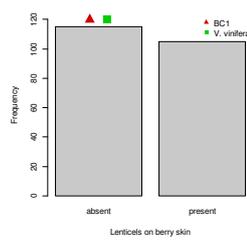
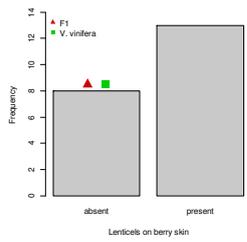
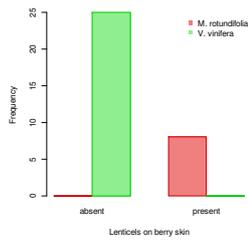
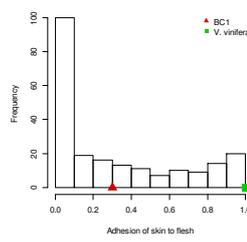
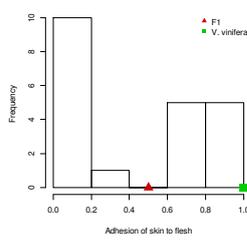
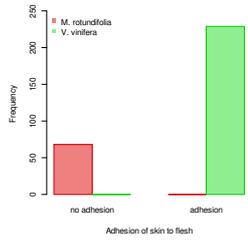
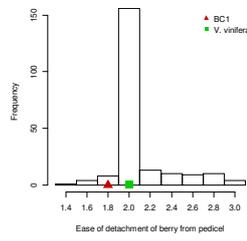
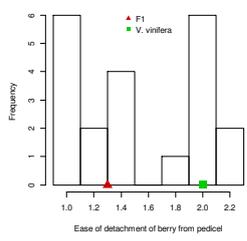
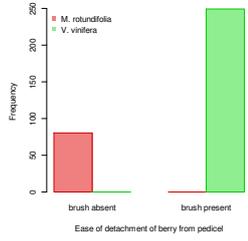
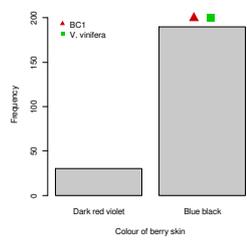
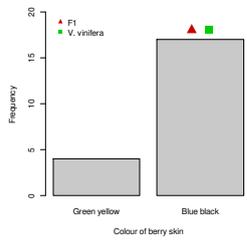
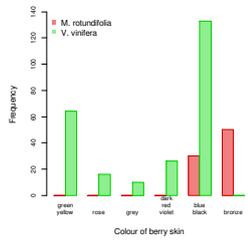
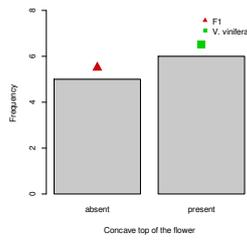
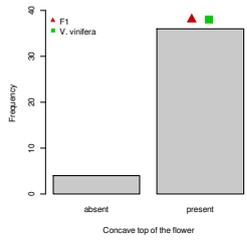
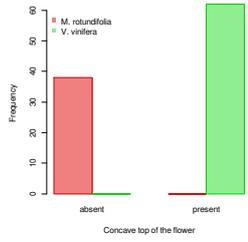
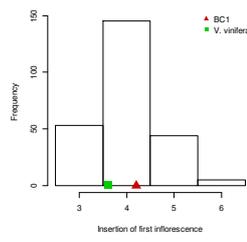
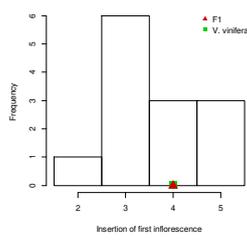
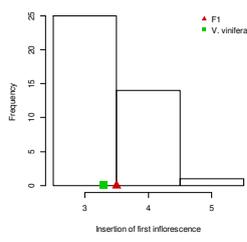
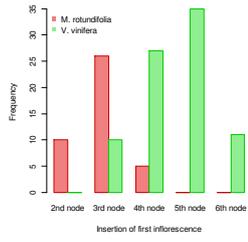
M. rotundifolia cv. Unnamed_11
(Bsize = small)

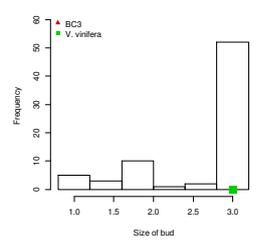
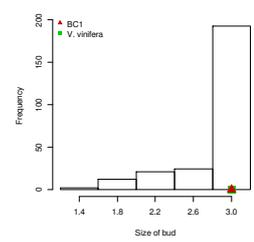
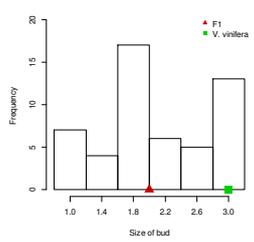
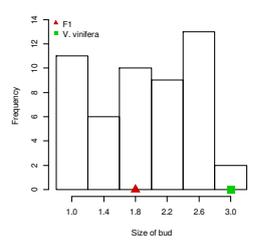
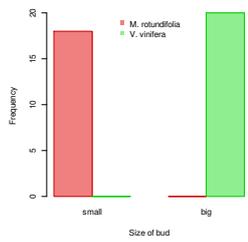
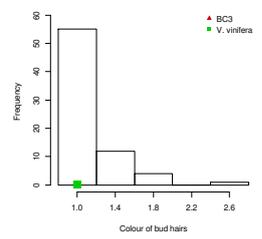
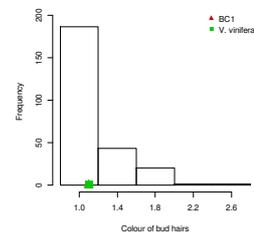
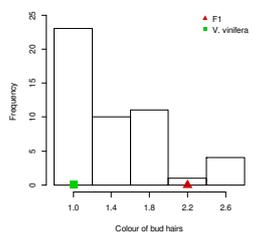
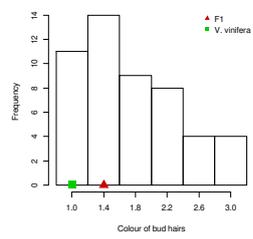
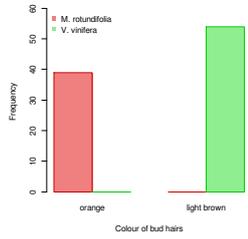
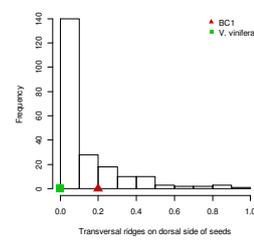
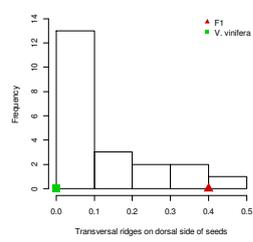
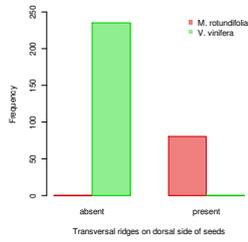
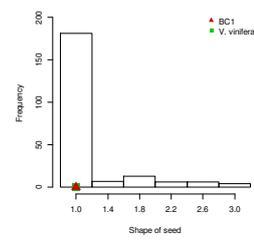
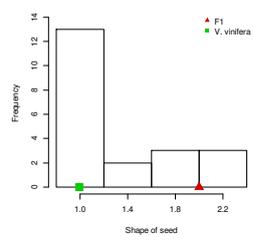
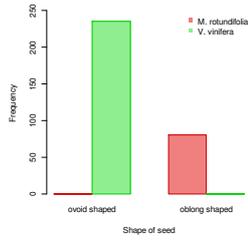
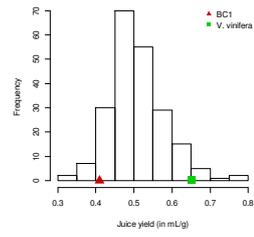
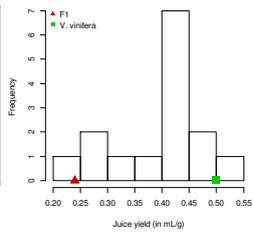
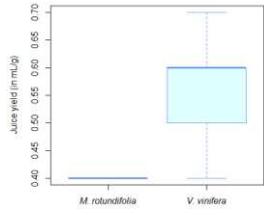


Figure S2: Ranges and distribution observed in *V. vinifera*, *M. rotundifolia* and in the BC populations. Column 1 shows the ranges observed between *V. vinifera* and *M. rotundifolia*. Column 2 – 5 show the distributions observed in the BC1 population in the vineyard (2) and in the greenhouse (3), in the BC2 population (4) and in the BC4 population (5).









Bibliographie

Références bibliographiques

- Agreste. Données en ligne disponibles sur : <https://stats.agriculture.gouv.fr/disar/faces/report/tabDocBySource.jsp>. Consulté le 23 mai 2017.
- Aktar-Uz-Zaman M., Tuhina-Khatun M., Hanafi M. M., Sahebi M., 2017. Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: an overview. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31 (3), 431-445.
- Aluko G., Martinez C., Tohme J., Castano C., Bergman C., Oard J. H., 2004. QTL mapping of grain quality traits from the interspecific cross *Oryza sativa* × *O. glaberrima*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (3), 630-639.
- Amante-Bordeos A., Sitch L. A., Nelson R., Dalmacio R. D., Oliva N. P., Aswidinnoor H., Leung H., 1992. Transfer of bacterial blight and blast resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to cultivated rice, *Oryza sativa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 84 (3-4), 345-354.
- Ambiaud, 2012. Fortes disparités de protection contre l'oïdium et le mildiou. Pratiques phytosanitaires dans la viticulture en 2010. *Agreste Primeur*, 289, 8p.
- Andersen M. B. S., Hall S., Dragsted L.O., 2011. Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from *Rosaceae* fruits. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 41 (1), 4-19.
- Anonyme, 2009. 2^{ème} édition de la liste des descripteurs OIV pour les variétés et espèces de *Vitis*. Paris, 233p.
- Anonyme, 2010. Nemapex Alain Bouquet. Fiche technique. 2p.
- Anonyme, 2013. Limagrain, la tomate et la biodiversité. *Les cahiers d'information de Limagrain*, 6p.
- Anonyme, 2017. *Éléments de conjoncture mondiale, Avril 2017*. OIV, 15p.
- Arroyo-García R., Ruiz-García L., Bolling L., Ocete R., Lopez M. A., Arnold C., Ergul A., Söylemezoğlu G., Uzun H. I., Cabello F., Ibáñez J., Aradhya M. K., Atanassov A., Atanassov I., Balint S., Cenis J. L., Costantini L., Gorislavets S., Grando M. S., Klein B. Y., McGovern P. E., Merdinoglu D., Pejic I., Pelsy F., Primikirios N., Risovannaya V., Roubelakis-Angelakis K. A., Snoussi H., Sotiri P., Tamhankar S., This P., Troshin L., Malpica J. M., Lefort F., Martinez-Zapater J. M., 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology*, 15 (12), 3707-3714.
- Atlagić J., 2004. Roles of interspecific hybridization and cytogenetic studies in sunflower breeding. *Hélios*, 27 (41), 1-24.
- Aurand J. M., 2014. *State of world vitiviniculture situation*. 37th world congress of vine and wine, Mendoza.
- Auriau P., Doussinault G., Jahier J., Lecomte C., Pierre J., Pluchard P., Rousset M., Saur L., Trottet M., 1992. *Le blé tendre*. Dans : Gallais A., Bannerot H. (Eds.). *Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection*. Editions Quae, Paris, 22-38.
- Austin S., Baer M. A., Helgeson J. P., 1985. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *Plant Science*, 39, 75-81.
- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bézier A., Lambert B., Joubert J. M., Pugin A., 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16 (12), 1118-1128.

- Bacilieri R., Lacombe T., Le Cunff L., Di Vecchi-Staraz M., Laucou V., Genna B., Péros J. P., This P., Boursiquot J. M., 2013. Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. *BMC Plant Biology*, 13, 25.
- Baek H. H., Cadwallader K. R., 1999. Contribution of free and glycosidically bound volatile compounds to the aroma of muscadine grape juice. *Journal of Food Science*, 64 (3), 441-444.
- Baek H. H., Cadwallader K. R., Marroquin E., Silva J. L., 1997. Identification of predominant aroma compounds in muscadine grape juice. *Journal of Food Science*, 62 (2), 249-252.
- Baize D., Deslais W., Saby N., 2007. *Teneurs en huit éléments en traces (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) dans les sols agricoles en France. Résultats d'une collecte de données à l'échelon national. Rapport final simplifié*. ADEME, Angers, Convention 0375 C0035, 86p.
- Banks P., Beversdorf W. D., 1987. The potential of self-incompatibility in spring rapeseed breeding. *Proceedings 7th International Rapeseed Congress*, Poznan, Poland, 11-14 mai, 264-268.
- Bannerot H., Bouldard L., Cauderon Y., Tempe J., 1974. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. *Proceedings of Eucarpia Meeting Cruciferae*, 25, 52-54.
- Barker C. L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M. B., Bouquet A., Adam-Blondon A. F., Thomas M. R., Dry I., 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (2), 370-377.
- Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A.-F., Cipriani G., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G., 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics*, 120 (1), 163-176.
- Benhamou N., Rey P., 2012. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. II. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection*, 92, 24-35.
- Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Dumas V., Mestre P., Merdinoglu D., 2012. A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 125 (8), 1663-1675.
- Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E.H., Mestre P., Merdinoglu D., 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 123 (1), 43-53.
- Bouquet A., 1980. *Vitis x Muscadinia* hybridization: A new way in grape breeding for disease resistance in France. *Proceedings of the third International Symposium on Grape Breeding*. Davis, University of California. 42-61.
- Bouquet A., 2009. Réduction des intrants phytosanitaires : Les variétés de vignes résistantes aux parasites. Vieille histoire ou nouvelles perspectives ? *Progrès Agricole et Viticole*, 126 (10), 234-243.
- Bradshaw J. E., Bryan G. J., Ramsay G., 2006. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilisation in potato breeding. *Potato Research*, 49 (1), 49-65.
- Bradshaw J. E., Ramsay G., 2005. Utilisation of the Commonwealth Potato Collection in potato breeding. *Euphytica*, 146 (1-2), 9-19.
- Brar D. S., Khush G. S., 1997. *Alien introgression in rice*. Dans : Sasaki T., Moore G. (eds). *Oryza: From Molecule to Plant*. Springer Netherlands, 35-47.

- Brar D. S., Dalmacio R., Elloran R., Aggarwal R., Angeles R., Khush G. S., 1996. *Gene transfer and molecular characterization of introgression from wild Oryza species into rice*. Dans : *Rice genetics III*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 477-486.
- Broman K. W., Wu H., Sen S., Churchill G. A., 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19 (7), 889-890.
- Brondani C., Rangel P., Brondani R., Ferreira M., 2002. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104 (6-7), 1192-1203.
- Brozynska M., Furtado A., Henry R. J., 2016. Genomics of crop wild relatives: expanding the gene pool for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 14 (4), 1070-1085.
- Bruetz E., Haidar R., Alou M. T., Vallance J., Bertsch C., Mazet F., Fermaud M., Deschamps A., Guerin-Dubrana L., Compant S., Rey P., 2015. Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1137.
- Brun H., Chèvre A. M., Fitt B. D., Powers S., Besnard A. L., Ermel M., Huteau V., Marquer B., Eber F., Renard M., Andrivon D., 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, 185 (1), 285-299.
- Butault J.-P., Delame N., Jacquet F., Zardet G., 2011. L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction. *Notes et études socio-économiques* n°35, Centre d'étude et de prospectives, Service de la statistique et de la prospective, 24p.
- Carbonneau A., Deloire A., Jaillard B., 2007. *La vigne : physiologie, terroir, culture*. Dunod, Paris, 441p.
- Chandler J. M., Jan C. C., Beard B. H., 1986. Chromosomal differentiation among the annual *Helianthus* species. *Systematic Botany*, 11 (1), 354-371.
- Chen J., Copes W. E., Miller R. W., Lamikanra O., 2001. *Diseases*. Dans : Basiouny F. M., Himelrick D. G. (eds) *Muscadine grapes*. ASHS Press, Alexandria, USA, 189-239.
- Chen H.G., Wu J.S., 2008. Characterization of fertile amphidiploid between *Raphanus sativus* and *Brassica alboglabra* and the crossability with *Brassica* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55 (1), 143-150.
- Chèvre A. M., Barret P., Eber F., Dupuy P., Brun H., Tanguy X., Renard M., 1997. Selection of stable *Brassica napus-B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression. *Theoretical and Applied Genetics*, 95 (7), 1104-1111.
- Chèvre A. M., Eber F., This P., Barret P., Tanguy X., Brun H., Delseny M., Renard M., 1996. Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus-B. nigra* addition lines. *Plant Breeding*, 115 (2), 113-118.
- Cohen J. I., Galinat W. C., 1984. Potential use of alien germplasm for maize improvement. *Crop Science*, 24 (6), 1011-1015.
- Colcol J.F., Baudoin A.B., 2016. Sensitivity of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* in Virginia to QoI Fungicides, Boscalid, Quinoxifen, Thiophanate Methyl, and Mefenoxam. *Plant Disease*, 100 (2), 337-344.
- Dalbó M. A., Ye G. N., Weeden N. F., Wilcox W. F., Reisch B. I., 2001. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126 (1), 83-89.

- Dalmacio R., Brar D. S., Ishii T., Sitch L. A., Virmani S. S., Khush G. S., 1995. Identification and transfer of a new cytoplasmic male sterility source from *Oryza perennis* into indica rice (*O. sativa*). *Euphytica*, 82 (3), 221-225.
- Dalmacio R. D., Brar D. S., Virmani S. S., Khush G. S., 1996. Male sterile line in rice (*Oryza sativa*) developed with *O. glumaepatula* cytoplasm. *International Rice Research Notes*, 21 (1), 22-23.
- Demangeat G., Voisin R., Minot J. C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D., 2005. Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retention of *Grapevine fanleaf virus* over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, 95 (10), 1151-1156.
- Demol J. (coord.), Baudoin J. P., Louant B. P., Maréchal R., Mergeai G., Otoul E., 2002. *Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en régions tropicales*. Presses Agronomiques de Gembloux. Gembloux, Belgique, 581p.
- Dermen H., 1964. Cytogenetics in hybridization of bunch and muscadine-type grapes. *Economic Botany*, 18 (2), 137-148.
- Detjen L. R., 1919. The limits in hybridization of *Vitis rotundifolia* with related species and genera. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, 17, 5-26.
- Di Gaspero G., Cipriani G., 2002. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (1), 163-172.
- Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S. D., Eibach R., Kozma P., Kovács L., 2012. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (2), 277-286.
- Dillemann G., 1954. L'hybridation interspécifique naturelle. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 101, 36-87.
- Doebley J. F., Gaut B. S., Smith B. D., 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127 (7), 1309-1321.
- Doebley J., Stec A., 1991. Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics*, 129, 285-295.
- Doublet B., Grosman J., Lecomte P., Bruez E., 2014. *Observatoire national des maladies du bois* [en ligne]. Disponible sur : <https://www.maladie-du-bois-vigne.fr/Maladies-du-bois/Observatoire-national-des-maladies-du-bois>. Consulté le 30 mai 2017.
- Duchêne E., Butterlin G., Dumas V., Merdinoglu D., 2012. Towards the adaptation of grapevine varieties to climate change: QTLs and candidate genes for developmental stages. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (4), 623-635.
- Duchêne E., Huard F., Dumas V., Schneider C., Merdinoglu D., 2010. The challenge of adapting grapevine varieties to climate change. *Climate research*, 41 (3), 193-204.
- Duchêne E., Legras J. L., Karst F., Merdinoglu D., Claudel P., Jaegli N., Pelsy F., 2009. Variation of linalool and geraniol content within two pairs of aromatic and non-aromatic grapevine clones. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15 (2), 120-130.
- Ector B. J., 2001. *Compositional and nutritional characteristics*. Dans : Basiouny F. M., Himelrick D. G. (eds) *Muscadine grapes*. ASHS Press, Alexandria, USA, 341-367.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Scientific report on the update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*: 20 November 2015. *EFSA Journal*, 14 (2), 4378.
- Eibach R., Töpfer R., 2003. Success in resistance breeding: 'Regent' and its steps into the market. *Acta Horticulturae*, 603, 687-691.

- Elloran R., Dalmacio R., Brar D. S., Khush, G. S., 1992. Production of backcross progenies from a cross of *Oryza sativa* × *O. granulata*. *Rice Genetics Newsletter*, 9, 39.
- Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One*, 6 (5), e19379.
- Ephytia, 2014. *Sensibilité des cépages de vigne aux principales maladies fongiques* [en ligne]. Disponible sur : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/6064/Vigne-Cepages-et-bioagresseurs>. Consulté le 1er juin 2017.
- Feechan A., Anderson C., Torregrosa L., Jermakow A., Mestre P., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Walker A. R., Cadle-Davidson L., Reish B., Aubourg S., Bentahar N., Shrestha B., Bouquet A., Adam-Blondon A. F., Thomas M. R., Dry I. B., 2013. Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. *The Plant Journal*, 76 (4), 661-674.
- Feechan A., Kocsis M., Riaz S., Zhang W., Gadoury D. M., Walker M. A., Dry I. B., Reisch B., Cadle-Davidson L., 2015. Strategies for *RUN1* deployment using *RUN2* and *REN2* to manage grapevine powdery mildew informed by studies of race specificity. *Phytopathology*, 105 (8), 1104-1113.
- Feldman M., Levy A. A., Fahima T., Korol A., 2012. Genomic asymmetry in allopolyploid plants: wheat as a model. *Journal of Experimental Botany*, 63 (14), 5045-5059.
- Fischer B. M., Salakhutdinov I., Akkurt M., Eibach R., Edwards K. J., Töpfer R., Zyprian E. M., 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (3), 501-515.
- Flamini R., Mattivi F., Rosso M. D., Arapitsas P., Bavaresco L., 2013. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10), 19651-19669.
- Galet P., 1988. *Cépages et Vignobles de France Tome I. Les Vignes Américaines*. 2^{ème} édition. Dehan, Montpellier, 555p.
- Galet P., 2000. *Dictionnaire encyclopédique des cépages*. Hachette, Italie, 936p.
- Gallais A., 1989. *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*. Masson, Paris, 588p.
- García de Cortázar-Atauri I., Chuine I., Donatelli M., Parker A. K., Van Leeuwen C., 2010. A curvilinear process-based phenological model to study impacts of climatic change on grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Proceedings of Agro*, 907-908.
- Garg H., Banga S., Bansal P., Atri C., Banga S. S., 2007. Hybridizing *Brassica rapa* with wild crucifers *Diplotaxis eruroides* and *Brassica maurorum*. *Euphytica*, 156 (3), 417-424.
- Garrier G., 2002. *Histoire sociale et culturelle du vin*. Larousse, Paris, 767p.
- Gaut B. S., Díez C. M., Morrell P. L., 2015. Genomics and the contrasting dynamics of annual and perennial domestication. *Trends in Genetics*, 31 (12), 709-719.
- Gautier J.-F., 1996. *Histoire du vin*, 2^{ème} édition. Presses universitaires de France, Paris, 128p.
- Ge S., Sang T., Lu B. R., Hong D. Y., 1999. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (25), 14400-14405.
- Gindro K., Godard S., De Groote I., Viret O., Forrer H. R., Dornart B., 2007. Peut-on stimuler les mécanismes de défense de la vigne ? Une nouvelle méthode pour évaluer le potentiel des éliciteurs. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 39 (6), 377-383.

- Gisi U., Sierotzki H., 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology*, 122 (1), 157-167.
- Glaubitz J. C., Casstevens T. M., Lu F., Harriman J., Elshire R. J., Sun Q., Buckler E. S., 2014. TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS One*, 9 (2), e90346.
- Goffinet M. C., Welser M. J., Himelrick D. G., 2001. *Anatomy and morphology*. Dans : Basiouny F. M., Himelrick D. G. (eds). *Muscadine grapes*. ASHS Press, Alexandria, USA, 15-50.
- Goldy R. G., Ramming D. W., Emershad R. L., Chaparro J. X., 1989. Increasing production of *Vitis vinifera* × *V. rotundifolia* hybrids through embryo rescue. *HortScience*, 24 (5), 820-822.
- Goodman R. M., Hauptli H., Crossway A., Knauf V. C., 1987. Gene transfer in crop improvement. *Science*, 236 (4797), 48-54.
- Grassi F., Labra M., Imazio S., Spada A., Sgorbati S., Scienza A., Sala F., 2003. Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (7), 1315-1320.
- Haggard J. E., Johnson E. B., Clair D. A. S., 2013. Linkage relationships among multiple QTL for horticultural traits and late blight (*P. infestans*) resistance on chromosome 5 introgressed from wild tomato *Solanum habrochaites*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3 (12), 2131-2146.
- Hajjar R., Hodgkin T., 2007. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, 156 (1-2), 1-13.
- Hanneman R. E., 1994. Assignment of endosperm balance numbers to the tuber-bearing Solanums and their close non-tuber-bearing relatives. *Euphytica*, 74 (1-2), 19-25.
- Harlan J. R., de Wet J. M., 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20 (4), 509-517.
- Hawkes J. G., Maxted N., Ford-Lloyd B. V., 2012. *The ex situ conservation of plant genetic resources*. Springer Science & Business Media, Birmingham, UK, 249p.
- Hill T., Ashrafi H., Chin-Wo S. R., Stoffel K., Truco M. J., Kozik A., Michelmore R., Van Deynze A., 2015. Ultra-high density, transcript-based genetic maps of pepper define recombination in the genome and synteny among related species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5 (11), 2341-2355.
- Himelrick D. G., 2001. *Vineyard site selection, establishment, and floor management*. Dans : Basiouny F. M., Himelrick D. G. (eds) *Muscadine grapes*. ASHS Press, Alexandria, USA, 133-151.
- Hoffmann S., Di Gaspero G., Kovács L., Howard S., Kiss E., Galbács Z., Testolin R., Kozma P., 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theoretical and Applied Genetics*, 116 (3), 427-438.
- Hunter N., Chambers S. R., Louis E. J., Borts R. H., 1996. The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *The EMBO journal*, 15 (7), 1726.
- IFV, 2009. *Les stades phénologiques de la vigne* [en ligne]. Disponible sur : http://www.vignevin.com/fileadmin/users/ifv/publications/Affiches_IFV/PosterStadPhen09.pdf. Consulté le 6 juillet 2017.
- Jelenkovic G., Olmo H. P., 1968. Cytogenetics of *Vitis*. III. Partially fertile F1 diploid hybrids between *V. vinifera* L. and *V. rotundifolia* Michx. *Vitis*, 7 (4), 281-293.
- Jelenkovic G., Olmo H. P., 1969. Cytogenetics of *Vitis*. IV. Backcross derivatives of *V. vinifera* L. and *V. rotundifolia* Michx. *Vitis*, 8 (1), 1-11.
- Jena K. K., Khush G. S., 1990. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Well ex Watt to cultivated rice, *O. sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 80 (6), 737-745.

- Kamei A., Tsuru M., Kubo N., Hayashi T., Wang N., Fujimura T., Hirai M., 2010. QTL mapping of clubroot resistance in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 120 (5), 1021-1027.
- Kauppi L., Jeffreys A. J., Keeney S., 2004. Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 5 (6), 413-424.
- Khush G. S., Bacalangco E., Ogawa T., 1990. A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genetics Newsletter*, 7, 121-122.
- King J., Grewal S., Yang C. Y., Hubbart S., Scholefield D., Ashling S., Edwards K. J., Allen A. M., BurrIDGE A., Bloor C., Davassi A., da Silva G. J., Chalmers K., King I. P., 2017. A step change in the transfer of interspecific variation into wheat from *Amblyopyrum muticum*. *Plant Biotechnology Journal*, 15 (2), 217-226.
- Kirtman B., Power S.B., Adedoyin J.A., Boer G.J., Bojariu R., Camilloni I., Doblas-Reyes F.J., Fiore A.M., Kimoto M., Meehl G.A., Prather M., Sarr A., Schär C., Sutton R., van Oldenborgh G.J., Vecchi G., Wang H.J., 2013. *Near-term Climate Change: Projections and Predictability*. Dans : Stocker T.F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V. and Midgley P.M. (eds.). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 953-1028.
- Komatsu K., Nagayama Y., Tanaka K., Ling Y., Cai S. Q., Omote T., Meselhy M. R., 2006. Comparative study of chemical constituents of rhubarb from different origins. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54 (11), 1491-1499.
- Kräuter R., Steinmetz A., Friedt W., 1991. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via "embryo rescue" and characterization of the hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 82 (4), 521-525.
- Kulathinal R. J., Stevison L. S., Noor M. A., 2009. The genomics of speciation in *Drosophila*: diversity, divergence, and introgression estimated using low-coverage genome sequencing. *PLoS Genetics*, 5 (7), e1000550.
- Lacombe T., 2012. *Contribution à l'étude de l'histoire évolutive de la vigne cultivée (Vitis vinifera L.) par l'analyse de la diversité génétique neutre et de gènes d'intérêt*. Thèse de doctorat du Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques, Montpellier. 328p.
- Lamikanra O., Grimm C. C., Inyang I. D., 1996. Formation and occurrence of flavor components in Noble muscadine wine. *Food Chemistry*, 56 (4), 373-376.
- Lee J. H., Johnson J. V., Talcott S. T., 2005. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (15), 6003-6010.
- Lelivelt C. L. C., Leunissen E. H. M., Frederiks H. J., Helsper J. P. F. G., Krens F. A., 1993. Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm) from *Sinapis alba* L. (White Mustard) to the *Brassica napus* L. gene pool by means of sexual and somatic hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 85 (6), 688-696.
- Le Maguet J., Fuchs J. J., Chadœuf J., Beuve M., Herrbach E., Lemaire O., 2013. The role of the mealybug *Phenacoccus aceris* in the spread of *Grapevine leafroll-associated virus- 1* (GLRaV-1) in two French vineyards. *European Journal of Plant Pathology*, 135 (2), 415-427.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25 (16), 2078-2079.

- Li L., Jean M., Belzile F., 2006. The impact of sequence divergence and DNA mismatch repair on homeologous recombination in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 45 (6), 908-916.
- Li Q., Lu Y., Pan C., Zhang J., Liu W., Yang X., Li X., Xi Y., Li L., 2016. Characterization of a Novel Wheat–2P Disomic Addition Line with Powdery Mildew Resistance. *Crop Science*, 56 (5), 2390-2400.
- Lin P. C., 2014. *Comparison of simultaneous distillation and extraction (SDE) and headspace solid phase microextraction (SPME) for determination of volatiles of muscadine grapes (Vitis rotundifolia)*. Thèse de master, Clemson University, 84p.
- Ling K. C., Aguiero V. M., Lee S. H., 1970. A mass screening method for testing resistance to grassy stunt disease of rice. *Plant Disease Reporter*, 54 (7), 565-69.
- Louarn J., 1992. *La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre caféiers diploïdes d'origine africaine (Genre Coffea L. sous-genre Coffea)*. Thèse de doctorat de l'Université de Paris-Sud, 329p.
- Lu J., Lamikanra O., 1996. Barriers to intersubgeneric crosses between *Muscadinia* and *Euveitis*. *HortScience*, 31 (2), 269-271.
- Marguerit E., Boury C., Manicki A., Donnart M., Butterlin G., Némorin A., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Ollat N., Decroocq S., 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 118 (7), 1261-1278.
- Martelli G.P., 2014. Directory of virus and virus diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1), 1-136.
- Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M. M., Sanchez J., Buckler E., Doebley J., 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (9), 6080-6084.
- Maxted N., Kell S. P., 2009. Establishment of a Global Network for the *In Situ* Conservation of Crop Wild Relatives: Status and Needs. *FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture*, 112p.
- Mazucca P., Ferranti P., Picariello G., Chianese L., Addeo F., 2005. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40 (1), 83-90.
- Merdinoglu D., Caranta C., 2013. *Quel déploiement de variétés de vigne résistantes au mildiou et à l'oïdium ?* Dans : Rousseau J., Chanfreau S., Bontemps E. (eds.). *Les cépages résistants aux maladies cryptogamiques : panorama européen*. Groupe ICV, 54-59.
- Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Coste P., Dumas V., Haetty S., Butterlin G., Greif C., 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Horticulturae*, 603, 451-456.
- Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Mestre P., Prado E., Schneider C., 2009. Apport de l'innovation variétale dans la réduction des intrants phytosanitaires au vignoble : exemple de la résistance au mildiou et à l'oïdium. *Progress Agricole et Viticole*, 126 (12), 290-293.
- Miller A. J., Gross B. L., 2011. From forest to field: perennial fruit crop domestication. *American Journal of Botany*, 98 (9), 1389-1414.
- Moreira F. M., Madini A., Marino R., Zulini L., Stefanini M., Velasco R., Kozma P., Grando M. S., 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes*, 7 (1), 153-167.

- Multani D. S., Jena K. K., Brar D. S., de los Reyes B. G., Angeles E. R., Khush G. S., 1994. Development of monosomic alien addition lines and introgression of genes from *Oryza australiensis* Domin. to cultivated rice *O. sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 88 (1), 102-109.
- Muñoz N., Liu A., Kan L., Li M. W., Lam H. M., 2017. Potential uses of wild germplasms of grain legumes for crop improvement. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2), 328.
- Myles S., Boyko A. R., Owens C. L., Brown P. J., Grassi F., Aradhya M. K., Prins B., Reynolds A., Chia J. M., Ware D., Bustamante C. D., Buckler E. S., 2011. Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (9), 3530-3535.
- Myles S., Chia J. M., Hurwitz B., Simon C., Zhong G. Y., Buckler E., Ware D., 2010. Rapid genomic characterization of the genus *Vitis*. *PloS One*, 5 (1), e8219.
- Narduzzi L., Stanstrup J., Mattivi F., 2015. Comparing wild American grapes with *Vitis vinifera*: a metabolomics study of grape composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (30), 6823-6834.
- Nault L. R., Gordon D. T., Damsteegt V. D., Iltis H. H., 1982. Response of annual and perennial teosintes (*Zea*) to six maize viruses. *Plant Disease*, 66 (1), 61-62.
- Nevo E., Chen G., 2010. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell & Environment*, 33 (4), 670-685.
- Newell C. A., Hymowitz T., 1982. Successful wide hybridization between the soybean and a wild perennial relative, *G. tomentella* Hayata. *Crop Science*, 22 (5), 1062-1065.
- Nicolas S. D., Péros J. P., Lacombe T., Launay A., Le Paslier M. C., Bérard A., Mangin B., Valière S., Martins F., Le Cunff L., Laucou V., Bacilieri R., Dereeper A., Chatelet P., This P., Doligez A., 2016. Genetic diversity, linkage disequilibrium and power of a large grapevine (*Vitis vinifera* L) diversity panel newly designed for association studies. *BMC plant biology*, 16, 74.
- Noor M. A., Bennett S. M., 2009. Islands of speciation or mirages in the desert? Examining the role of restricted recombination in maintaining species. *Heredity*, 103 (6), 439.
- Ochssner I., Hausmann L., Töpfer R., 2016. *Rpv14*, a new genetic source for *Plasmopara viticola* resistance conferred by *Vitis cinerea*. *Vitis*, 55 (2), 79-81.
- Ollat N., Bordenave L., Tandonnet J.P., Boursiquot J.M., Marguerit E., 2016. Grapevine rootstock: origins and perspectives. *Acta Horticulturae*, 1136, 11-22.
- Olien W. C., 2001. *Introduction to the Muscadines*. Dans : Basiouny F. M., Himelrick D. G. (eds) *Muscadine grapes*. ASHS Press, Alexandria, USA, 1-13.
- Olien W. C., Hegwood C. P., 1990. Muscadine – a classic southeastern fruit. *HortScience*, 25 (7), 726-831.
- Oliver J. E., Fuchs M., 2011. Tolerance and resistance to viruses and their vectors in *Vitis* sp.: a virologist's perspective of the literature. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62 (4), 438-451
- Olmo H. P., 1986. The potential role of (*vinifera* x *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 42 (8), 921-926.
- Ortiz R., Ehlenfeldt M. K., 1992. The importance of endosperm balance number in potato breeding and the evolution of tuber-bearing *Solanum* species. *Euphytica*, 60 (2), 105-113.
- Palloix A., Ayme V., Moury B., 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist*, 183 (1), 190-199.

- Pap D., Riaz S., Dry I. B., Jermakow A., Tenschler A. C., Cantu D., Oláh R., Walker M. A., 2016. Identification of two novel powdery mildew resistance loci, *Ren6* and *Ren7*, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biology*, 16, 170.
- Papura D., Burbán C., van Helden M., Giresse X., Nusillard B., Guillemaud T., Kerdelhué C., 2012. Microsatellite and mitochondrial data provide evidence for a single major introduction for the nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* in Europe. *PLoS One*, 7 (5), e36882.
- Pastrana-Bonilla E., Akoh C. C., Sellappan S., Krewer G., 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (18), 5497-5503.
- Patel G. I., Olmo H. P., 1955. Cytogenetics of *Vitis*: I. The hybrid *V. vinifera* × *V. rotundifolia*. *American Journal of Botany*, 42 (2), 141-159.
- Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A.-F., 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 (8), 1201-1210.
- Pellan-Delourme R., Renard M., 1988. Cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.): female fertility of restored rapeseed with "Ogura" and cybrids cytoplasm. *Genome*, 30 (2), 234-238.
- Peressotti E., Wiedemann-Merdinoglu S., Delmotte F., Bellin D., Di Gaspero G., Testolin R., Merdinoglu D., Mestre P., 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology*, 10, 147.
- Philouze J., Laterrot H., 1992. *La tomate*. Dans : Gallais A., Bannetot H. (Eds.). *Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection*. Editions Quae, Paris, 379-391.
- Planchon J.E., 1887. *Monographie des Ampélidées vrais*. Dans : De Candolle A., De Candolle C. [eds]. *Monographiae Phanaerogamarum*. Vol. 5. G. Masson, Paris, France, 305–654.
- Pl@ntGrape, 2011. *Catalogue des cépages inscrits en France* [en ligne]. Disponible sur : <http://plantgrape.plantnet-project.org/cepages>. Consulté le 1er juin 2017.
- Prasad M. S. L., Sujatha M., Alivelu K., Sujatha K., 2017. Sources of resistance to *Alternariaster* leaf blight in sunflower pre-breeding lines derived from interspecific crosses and wild *Helianthus* species. *Crop Protection*, 92, 70-78.
- Prischmann D. A., Dashiell K. E., Schneider D. J., Eubanks M. W., 2009. Evaluating *Tripsacum*-introgressed maize germplasm after infestation with western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Applied Entomology*, 133 (1), 10-20.
- Quenouille J., Montarry J., Palloix A., Moury B., 2013. Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Molecular Plant Pathology*, 14 (2), 109-118.
- Quéré C., Sermier J.M., 2015. *Les maladies de la vigne et du bois*. Rapport d'information de la commission du développement et de l'aménagement du territoire n°2946. 123p.
- Rahman L., Khanam S., JaeHwan R., 2011. Mapping of QTLs involved in resistance to rice blast (*Magnaporthe grisea*) using *Oryza minuta* introgression lines. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47 (3), 85-94.
- Ramming D. W., Gabler F., Smilanick J., Cadle-Davidson M., Barba P., Mahanil S., Cadle-Davidson L., 2011. A single dominant locus, *Ren4*, confers rapid non-race-specific resistance to grapevine powdery mildew. *Phytopathology*, 101 (4), 502-508.

- Rex F., Fechter I., Hausmann L., Töpfer R., 2014. QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock 'Börner' (*V. riparia* Gm183 × *V. cinerea* Arnold). *Theoretical and Applied Genetics*, 127 (7) 1667-1677.
- Reynier A., 2007. *Manuel de viticulture*, 10^{ème} édition. Editions Tech&Doc, Lavoisier, Paris, 532p.
- Riaz S., Krivanek A. F., Xu K., Walker M. A., 2006. Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, *PdR1*, and *Sex* on an extended genetic map of *Vitis rupestris* × *V. arizonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 113 (7), 1317-1329.
- Riaz S., Tenschler A. C., Ramming D. W., Walker M. A., 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 122 (6), 1059-1073.
- Riaz S., Tenschler A. C., Rubin J., Graziani R., Pao S. S., Walker M. A., 2008. Fine-scale genetic mapping of two Pierce's disease resistance loci and a major segregation distortion region on chromosome 14 of grape. *Theoretical and Applied Genetics*, 117 (5), 671-681.
- Rieseberg L. H., Baird S. J., Gardner K. A., 2000. Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Molecular Biology*, 42 (1), 205-224.
- Ross H., 1979. Wild species and primitive cultivars as ancestors of potato varieties. *Proceedings of the conference Broadening the genetic base of crops*, Wageningen, Netherlands, 237-245.
- Rousseau J., 2013. Les cépages résistants aux maladies : Une alternative durable aux pesticides. *Revue des œnologues et des techniques vitivinicoles et œnologiques*, 149, 12-14.
- Rousseau J., Chanfreau S., 2013. *Création de cépages résistants : une histoire américano-européenne*. Dans : Rousseau J., Chanfreau S., Bontemps E. (eds.). *Les cépages résistants aux maladies cryptogamiques : panorama européen*. Groupe ICV, 10-16.
- Rousselle P., Rousselle-Bourgeois F., Ellisèche D., 1992. *La pomme de terre*. Dans : Gallais A., Bannerot H. (Eds.). *Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection*. Editions Quae, Paris, 243-260.
- Roy N. N., 1984. Interspecific transfer of *Brassica juncea*-type high blackleg resistance to *Brassica napus*. *Euphytica*, 33 (2), 295-303.
- Sacristán M. D., Gerdemann M., 1986. Different behavior of *Brassica juncea* and *B. carinata* as sources of *Phoma lingam* resistance in experiments of interspecific transfer to *B. napus*. *Plant Breeding*, 97 (4), 304-314.
- Scafaro A. P., Haynes P. A., Atwell B. J., 2010. Physiological and molecular changes in *Oryza meridionalis* Ng., a heat-tolerant species of wild rice. *Journal of Experimental Botany*, 61 (1), 191-202.
- Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R., 2012. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (1), 163-176.
- Sengupta S., Majumder A. L., 2010. *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a wild rice: a potential model for studying salt-stress biology in rice. *Plant, Cell & Environment*, 33 (4), 526-542.
- Singh R. J., Kollipara K. P., Hymowitz T., 1990. Backcross-derived progeny from soybean and *Glycine tomentella* Hayata intersubgeneric hybrids. *Crop Science*, 30 (4), 871-874.
- Singh R. J., Nelson R. L., 2015. Intersubgeneric hybridization between *Glycine max* and *G. tomentella*: production of F1, amphidiploid, BC1, BC2, BC3, and fertile soybean plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 128 (6), 1117-1136.
- Small J.K., 1913. *Vitis and Muscadinia*. Dans : *Flora of the southeastern United States*, 2nd edition, New York, 752-757.

- Smukowski C. S., Noor M. A. F., 2011. Recombination rate variation in closely related species. *Heredity*, 107 (6), 496.
- Snowdon R. J., Winter H., Diestel A., Sacristan M. D., 2000. Development and characterisation of *Brassica napus*-*Sinapis arvensis* addition lines exhibiting resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 (7), 1008-1014.
- Sondahl M. R., Evans D. A., Prioli L. M., Silva W. J., 1984. Tissue culture regeneration of plants in *Zea diploperennis*, a close relative of corn. *Nature Biotechnology*, 2 (5), 455-458.
- Stevens M. A., Rick C. M., Atherton J. G., Rudich J., 1986. Chapter 2: Genetics and Breeding. Dans : Atherton J. G., Rudich J. (eds). *The tomato crop: A scientific basis for improvement*. Chapman and Hall, New York, USA, 35-110.
- Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H., Matsumoto S., Hirai M., 2003. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (6), 997-1002.
- Talcott S. T., Lee J. H., 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (11), 3186-3192.
- Thalapati S., Batchu A. K., Neelamraju S., Ramanan R., 2012. *Os11Gsk* gene from a wild rice, *Oryza rufipogon* improves yield in rice. *Functional & Integrative Genomics*, 12 (2), 277-289.
- This P., Lacombe T., Thomas M. R., 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22 (9), 511-519.
- U N., 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 7 (7), 389-452.
- van der Meer M., Weibel F., Levite D., Häseli A., Vombach D., 2010. Acceptation des vins de cépages résistants par les consommateurs. Résultats du projet TOPIwi 2007-2008. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 42 (2), 147-150.
- van Ooijen J.W., Voorrips R.E., 2001. JoinMap® 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, Netherlands.
- Van Zyl S., Vivier M.A., Riaz S., Walker M.A., 2014. The genetic mapping of *Xiphinema index* resistance derived from *Vitis arizonica*. *Acta Horticulturae*, 1046, 165-168.
- Varshney R. K., Nayak S. N., May G. D., Jackson S. A., 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*, 27 (9), 522-530.
- Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Cindrić P., Kozma P., Scalabrin S., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G., 2013. Historical introgression of the downy mildew resistance gene *Rpv12* from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *PLoS One*, 8 (4), e61228.
- Viljoen T. A., Spies J. J., 1995. Cytogenetical studies of three *Vitis* species. *Vitis*, 34 (4), 221-224.
- Volle M.-J., Boyer G., Reyne J., 2007. Les inventeurs d'hybrides au secours du vignoble. *Cahier de Mémoire d'Ardèche et Temps Présent*, 95, 9p.
- Walker M.A., Lund K., Aguero C., Riaz S., Fort K., Heinritz C., Romero N., 2014. Breeding grape rootstock for resistance to phylloxera and nematodes – It's not always easy. *Acta Horticulturae*, 1045, 89-97.
- Welter L.J., Göktürk-Baydar N., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Töpfer R., Zyprian E.M., 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding*, 20 (4), 359-374.

- Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Coste P., Dumas V., Butterlin G., Bouquet A., Merdinoglu D., 2006. Genetic analysis of resistance to downy mildew from *Muscadinia rotundifolia*. 9th International Conference on Grape genetics and Breeding, Udine, Italie.
- Wiener P., Wilkinson S., 2011. Deciphering the genetic basis of animal domestication. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 278 (1722), 3161-3170.
- Wilson J. A., Ross W. M., 1962. Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevi* cytoplasm. *Wheat Information Service*, 14, 29-30.
- Wu T. D., Nacu S., 2010. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*, 26 (7), 873-881.
- Wulff B. B., Moscou M. J., 2014. Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Frontiers in Plant Science*, 5, 692.
- Xu K., Riaz S., Roncoroni N. C., Jin Y., Hu R., Zhou R., Walker M. A., 2008. Genetic and QTL analysis of resistance to *Xiphinema index* in a grapevine cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 116 (2), 305-311.
- Zamir D., Ekstein-Michelson I., Zakay Y., Navot N., Zeidan M., Sarfatti M., Eshed Y., Harel E., Pleban T., van-Oss H., Kedar N., Rabinowitch H. D., Czosneck H., 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics*, 88 (2), 141-146.
- Zhang J., Hausmann L., Eibach R., Welter L. J., Töpfer R., Zyprian E. M., 2009. A framework map from grapevine V3125 (*Vitis vinifera* 'Schiava grossa' × 'Riesling') × rootstock cultivar 'Börner' (*Vitis riparia* × *Vitis cinerea*) to localize genetic determinants of phylloxera root resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 119 (6), 1039-1051.
- Zhu J., Struss D., Röbbelen G., 1993. Studies on resistance to *Phoma lingam* in *Brassica napus*-*Brassica nigra* addition lines. *Plant Breeding*, 111 (3), 192-197.
- Zhu L., Zhang Y., Lu J., 2012. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (3), 3492-3510.
- Zyprian E., Ochssner I., Schwander F., Šimon S., Hausmann L., Bonow-Rex M., Moreno-Sanz P., Grando M. S., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Eibach R., Töpfer R., 2016. Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines. *Molecular Genetics and Genomics*, 291 (4), 1573-1594.