

Application d'une méthode d'électrophorèse pour la caractérisation et la reconnaissance des porte-greffe

par

J. M. BOURSIQUOT¹⁾ et P. PARRA²⁾

¹⁾ Chaire de Viticulture, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, France

²⁾ Laboratoire de la Station de Recherches Viticoles, Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier, France

Résumé : L'étude par électrophorèse (gel d'amidon) de la glucose-phosphate-isomérase (GPI, EC 5.3.1.9) sur des extraits obtenus à partir des jeunes racines ou de sarments aoûtés a montré que ce type de matériel végétal pouvait être utilisé en vue de l'identification des porte-greffe. Pour les racines, les meilleurs résultats ont été obtenus à partir de plants dont le feuillage était en bon état et en début de phase de croissance. L'utilisation de sarments s'est révélée en définitive plus facile et plus intéressante au niveau de la réalisation des extraits et de la netteté des séparations.

La variabilité observée pour le système enzymatique GPI-2 sur les trente porte-greffe autorisés en France s'avère intéressante dans une optique taxonomique et la stabilité des résultats a été confirmée. Neuf phénotypes différents (dont trois non signalés jusqu'à présent) ont été mis en évidence permettant de caractériser et de reconnaître cinq porte-greffe (Fercal, 41 B, 333 E.M., 161-49 C, Vialla) et de répartir les autres en quatre groupes. L'étude d'un système complémentaire au moins devra être envisagée pour pouvoir séparer l'ensemble de ces porte-greffe.

Utilization of isozyme analysis to the characterization and the identification of rootstocks

S u m m a r y : Isozyme analysis by starch gel electrophoresis for glucosephosphate isomerase (GPI, EC 5.3.1.9) from roots and woody canes extracts showed that this material can be used for identification of the rootstocks. Concerning the roots the best results were obtained at the first stage of growth (during spring) when the plants were in good physiological state but this material is rather delicate. It is easier and more interesting to work with extracts of scrapings from woody canes which give good results and fair resolutions.

The variability of the GPI-2 system is interesting for taxonomy and the stability of the results has been confirmed. Nine phenotypes have been found with the thirty rootstocks tested. It is possible to characterize Fercal, 41 B, 333 E.M., 161-49 C, and Vialla. The other rootstocks can be sorted in four groups. Analysis of a complementary enzyme system at least will be necessary to characterize all these rootstocks.

Key words : ampelography, electrophoresis, grape, isozyme, rootstock, Vitis.

Introduction

Avec l'utilisation généralisée des greffés-soudés se pose pour les techniciens, les vignerons et les pépiniéristes le problème de la détermination des porte-greffe afin de s'assurer de l'identité du matériel végétal qu'ils utilisent, qu'ils achètent ou qu'ils (re)-vendent.

En effet les différences ampélographiques classiques (anatomiques et morphologiques) des bois et des racines sont souvent très faibles et sujettes à une grande fluctuation ce qui rend impossible la reconnaissance des variétés de porte-greffe. Dans cette optique l'utilisation d'une méthode biochimique basée sur l'analyse des racines ou des bois pourrait être d'une grande utilité et permettrait de surmonter cette difficulté. Par ailleurs, le nombre de porte-greffe utilisés est restreint et défini par la loi. En France,

30 variétés de porte-greffe sont autorisées (Tableau). C'est un élément important qui nous a poussé à envisager l'application d'une méthode d'électrophorèse qui s'est développée sur la vigne depuis les travaux réalisés par WOLFE (1976) et SCHWENNESEN *et al.* (1982).

Tableau

Liste des 30 porte-greffe inscrits pour la France et concernés par cette étude.

List of the 30 rootstocks allowed in France and concerned by this study.

Composition génétique	Porte-greffe
<i>Vitis riparia</i>	Riparia Gloire de Montpellier
<i>Vitis rupestris</i>	Rupestris du Lot
Riparia-Rupestris	101-14 MGt, 3309 C
Riparia-Rupestris-Berlandieri	Gravesac
Riparia-Rupestris-Cordifolia	44-53 Ma
Riparia-Rupestris-Vinifera	196-17 Cl, 4010 Cl
Riparia-Rupestris-Solonis	216-1 Cl, G 1
Riparia-Solonis	1616 C
Riparia-Berlandieri	420 A MGt, 161-49 C, 34 E.M., 8 B, 5BB, 5 C, S04, 125 AA, R.S.B. 1
Rupestris-Berlandieri	99 R, 110 R, 140 Ru, 1103 Pa, 1447 Pa
Vinifera-Berlandieri	41 B MGt, 333 E.M., B.C. N°2, Fercal
Labrusca-Riparia	Vialla

Matériel et méthodes

Extraction : Après différents essais, la méthode qui a donné les meilleurs résultats est celle proposée par ARULSEKAR et PARFITT (1986). On réalise un broyage (broyeur à lame) du matériel végétal en présence de 1 g de polyvinylpyrrolidone et de 10 ml de tampon d'extraction (pH = 8) contenant pour 1 litre: 6,5 g de Tris base (0,05 M), 1,5 g d'acide citrique (0,007 M), 1 g de cystéine (0,1 %), 1 g d'acide ascorbique (0,1 %), 10 g de polyéthylène glycol 4000 (1 %), 0,08 ml de mercaptoethanol (0,001 M).

Ces opérations se réalisent en chambre froide (2 °C), avec des récipients et du matériel sortant du congélateur.

Le matériel végétal utilisé a deux origines différentes:

- 2 g de jeunes racines en activité et non lignifiées. Elles sont sectionnées en chambre froide juste avant le broyage qui doit se réaliser aussitôt après. Les plantes utilisées sont soit des racinés de porte-greffe cultivés en pot avec du terreau, soit des boutures mises à raciner sur couche chaude de perlite en serre ou dans de l'eau maintenue à 28 °C avec agitation.
- 2 g de sarments aoûtés. Les bois (d'un mètre environ) ont été récoltés à l'automne dans les collections de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. Ils peuvent être conservés en chambre froide (plusieurs semaines). Au moment de l'extraction, les merithalles médians sont pelés (en chambre froide) à l'aide d'un greffoir ou d'un scalpel (élimination de l'écorce). Des petits copeaux de bois contenant une faible part de liber, le cambium et surtout du xylème sont prélevés pour être ensuite broyés.

La durée de broyage est de 15 secondes. L'extrait est ensuite centrifugé en chambre froide à 7000 g pendant 10 min. Le surnageant limpide est récupéré dans un pillu-

lier préalablement refroidi et maintenu sur de la glace.

Cet extrait est alors prêt pour être analysé. Il peut être conservé quelques jours au congélateur mais les résultats obtenus sont meilleurs si l'analyse est effectuée aussitôt.

Préparation du gel : A la suite de plusieurs essais nous avons obtenu les meilleures migrations et séparations avec les tampons suivants (PASTEUR *et al.* 1987).

Le tampon «gel» (pH = 8,3) est une dilution du tampon «électrode» (100 ml pour 900 ml d'eau) à laquelle on ajoute 5,58 g de Tris (0,046 M) et 1,44 g d'acide citrique monohydraté (0,007 M).

Le tampon «électrode» (pH = 8,1) est composé pour 5 l d'eau de 6 g d'hydroxyde de lithium et de 59,5 g d'acide borique.

Le gel, réalisé à partir de 48 g de fécule de pomme de terre hydrolysée et de 400 ml de tampon «gel», a pour dimensions: 18 cm de long, 22 cm de large et 1 cm d'épaisseur.

Mise en place des extraits : Une partie aliquote de l'extrait est absorbée sur des petits rectangles de papier Wathman n° 3 (3 × 9 mm) qui sont introduits dans une fente pratiquée dans le gel en suivant une ligne perpendiculaire au sens de la migration, à 5 cm du bord côté cathode. Du Bleu de Bromophénol à 0,5 % peut être ajouté aux rectangles de papier pour mieux visualiser le front de migration.

Electrophorèse : Le générateur de courant continu utilisé est un Stavip (Apelex) 1000 D. On obtient une tension initiale de 580 V pour 125 mA et 75 W. Lorsque le front a migré d'environ 1 cm (30 min), on arrête momentanément l'électrophorèse pour ôter les papiers ayant servi à déposer les extraits afin qu'ils n'interfèrent pas dans la régularité de la migration. Au total l'électrophorèse dure environ 3 h. Elle est arrêtée lorsque le Bleu de Bromophénol a migré de 8 cm. La basse température est maintenue à l'aide d'un circuit d'eau glycolée réfrigérée qui passe sous la cuve et grâce à des réfrigérants (glace artificielle) placés sur le gel.

Révélation : Le gel est découpé en trois tranches dans le sens de l'épaisseur. La tranche correspondant à la face supérieure du gel est éliminée car les révélations réalisées avec celle-ci donnent de mauvaises séparations (PALUDETTI et CALO 1988) avec des trainées dues certainement à des effets de surface. Pour l'instant le principal système enzymatique testé a été la glucose-phosphate-isomérase (GPI, EC 5.3.1.9), système conseillé par divers auteurs (SUBDEN *et al.* 1987; PARFITT et ARULSEKAR 1989; CALO *et al.* 1989) et par l'Office International de la Vigne et du Vin.

On fait incuber le gel à l'obscurité et à 32 °C pendant 1—2 h après l'avoir recouvert avec la solution de révélation suivante (PASTEUR *et al.* 1987): 30 ml de tampon Tris-HCl 0,2 M pH = 8, MgCl₂ (1 ml à 0,5 M), Fructose-6-Phosphate (10 mg), NAD (1 ml à 1 %), NADP (0,5 ml à 1 %), Glucose-6-Phosphate-Deshydrogénase (17 unités), PMS (0,5 ml à 1 %), NBT (0,5 ml à 1 %), MTT (0,5 ml à 1 %), Agarose (10 ml à 1,5 %).

Résultats et discussion

Nous avons réalisé les analyses sur racines pendant deux ans (printemps 1990, printemps 1991) et sur bois au cours de l'automne-hiver 1991—1992. Les résultats que nous présentons ici proviennent de nombreuses répétitions réalisées à différentes époques qui nous ont permis de vérifier et de nous assurer de la stabilité et de la fiabilité de la méthode au cours du temps. Le Fercal a été choisi comme témoin et a servi dans toutes les analyses et révélations qui ont été faites. Les mesures de migration et les observations ont pu être ainsi toujours rapportées relativement à ce témoin. La stabilité des résultats sur ce porte-greffe a été particulièrement bien vérifiée.

Avec la glucose-phosphate-isomérase et sur le matériel étudié on constate la présence de deux régions (WEEDEN *et al.* 1988), GPI-1 et GPI-2. GPI-1 est la région la plus proche de l'anode (de plus grande mobilité) ou ne se trouve qu'une bande sans variabilité génotypique. GPI-2, située en dessous de GPI-1 (mobilité plus faible), présente en revanche un polymorphisme beaucoup plus intéressant d'un point de vue taxonomique (PARFITT et ARULSEKAR 1989) c'est pourquoi les résultats présentés ici ne concernent que les bandes situées dans cette région.

Les phénotypes que nous avons observés sur les racines (racinés, boutures dans la perlite ou dans l'eau) se sont montrés semblables et identiques à ceux obtenus sur les sarments (mètres greffables) ce qui est en accord avec les observations antérieures (SUBDEN *et al.* 1987). Cependant les révélations se sont montrées souvent plus nettes avec les sarments qu'avec les racines. Pour obtenir de bonnes séparations avec les racines (Photo) les extraits doivent être réalisés préférentiellement au début du printemps sur des racines peu lignifiées et avec des plantes en bon état physiologique et en phase de croissance.

L'activité du plant paraît nécessaire pour obtenir des résultats fiables et répétitifs avec les racines. De plus, ces extraits sont assez sensibles aux phénomènes d'oxydations et semblent présenter davantage de liaisons protéines-polyphénols que les extraits réalisés à partir des sarments ce qui rend les révélations moins lisibles. En revanche, l'utilisation de copeaux de sarments présente plusieurs avantages. Cela permet d'obtenir en général de meilleurs résultats (séparations plus nettes) et les prélèvements sont beaucoup plus simples à réaliser car les sarments peuvent être facilement conservés en chambre froide. C'est pourquoi ce matériel nous semble être plus intéressant.

Pour les 30 porte-greffe nous avons observé en tout neuf phénotypes différents (Photo). Par rapport aux 18 phénotypes signalés par SUBDEN *et al.* (1987) et aux 12 phénotypes proposés par PARFITT et ARULSEKAR (1989) et par CALO *et al.* (1989), on s'aperçoit que les résultats que nous obtenons peuvent, pour certains, correspondre à ceux trouvés par ces auteurs (Figure).

Cependant les correspondances et les relations ne sont pas toutes aisées à établir. Trois phénotypes au moins observés au cours de cette étude semblent n'avoir pas été signalés auparavant. Il y aurait donc en définitive plus de phénotypes qu'on ne le pen-

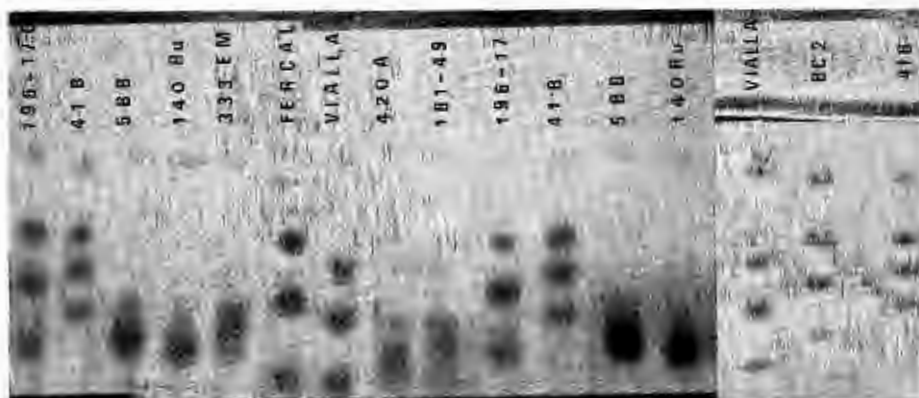


Photo: Résultats obtenus avec des extraits réalisés à partir de copeaux de sarments et montrant les 9 phénotypes mis en évidence chez les 30 porte-greffe étudiés; à droite quelques résultats obtenus avec des racines.

Results obtained with extracts of scrapings from woody canes showing the nine phenotypes found for the 30 rootstocks tested; some examples for roots extracts on the right.

sait au départ. La présence d'espèces différentes, autres que *Vitis vinifera*, et de croisements entre espèces est à mettre en relation avec cette diversité. Les différences de mobilité qui sont parfois faibles et nuancées rendent complexe l'observation des résultats et exigent de la précision et un nombre suffisant de répétitions. C'est pourquoi il sera préférable et pratiquement nécessaire de travailler par comparaison avec des références pour tous les problèmes de reconnaissance. On peut également remarquer que, pour la GPI, tous les phénotypes ne se rencontrent pas chez les 30 porte-greffe étudiés puisque neuf seulement ont été mis en évidence. La répartition des porte-greffe en fonction des phénotypes est indiquée dans la légende de la Figure.

Grâce à l'analyse de ce seul système enzymatique (GPI-2) on s'aperçoit qu'il est possible de caractériser et de reconnaître certains porte-greffe comme: Le Fercal, le 41B, le 333 E.M., le 161-49 C, le Vialla et de répartir les autres dans 4 groupes distincts mais d'inégale importance (2, 2, 8 et 13 porte-greffe).

Il faudra donc envisager en complément l'étude d'autres systèmes enzymatiques (par exemple l'aspartate-amino-transférase, EC 2.6.1.1), pour pouvoir distinguer et discriminer l'ensemble des porte-greffe étudiés. Un seul système complémentaire sera nécessaire pour séparer le 420 A du 34 E.M. et le BC N° 2 du 196-17 Cl mais pour les deux autres groupes il faudra certainement en envisager plusieurs.

Les analyses et interprétations génétiques réalisés par WEEDEN *et al.* (1988) et par PARFITT et ARULSEKAR (1989) sur ce système enzymatique (GPI-2) permettent d'envisager qu'il s'agit d'un enzyme dicaténaire résultant de l'expression de deux allèles d'un même gène à un seul locus. Les individus (diploïdes) homozygotes présentent alors une bande et les hétérozygotes trois bandes (avec la bande intermédiaire résultant de l'hybridation des deux autres).

a	-----	-----	-----						
b				-----					
c	-----								
d		-----							
e			-----						
f	-----			-----	-----				
g					-----				
h		-----			-----	-----	-----	-----	-----
h'					-----				
i									-----
i'									-----
j			-----	-----					-----
	acf	adh	aej	bfj	fgh	h	h'i'j	h	hij
	J	A		H	D				
	9	10			6			7	12

Figure: Représentation schématique des phénotypes observés sur les trente porte-greffe étudiés. Les mobilités sont désignées par des lettres dans la marge de gauche. Les phénotypes peuvent être définis par les mobilités des bandes présentes; acf (1): 41 B; adh (2): BC N° 2, 196-17 Cl; aej (1): Fercal; bfj (1): Vialla; fgh(1): 333 E.M.; h' (8): Riparia Gloire de Montpellier, 101-14 MGT, Gravesac, G 1, 216-3 Cl, 1616 C, R.S.B. 1, 5 BB; h'i'j (1): 161-49 C; h (13): Rupestris du Lot, 3309 C, 44-53 Ma, 4010 Cl, 99 R, 110 R, 1103 Pa, 1447 Pa, 140 Ru, 5 C, SO4, 125 AA, 8 B; hij (2): 420 A, 34 E.M.. Les correspondances avec les phénotypes signalés par SUBDEN *et al.* (majuscules) et par PARFITT et ARULSEKAR (nombres) sont proposées.

Diagram of the phenotypes found with the thirty rootstocks. Mobilities are designated by letters on the left. Phenotypes are characterized by mobility patterns; acf (1): 41 B; adh (2): BC N° 2, 196-17 Cl; aej (1): Fercal; bfj (1): Vialla; fgh(1): 333 E.M.; h' (8): Riparia Gloire de Montpellier, 101-14 MGT, Gravesac, G 1, 216-3 Cl, 1616 C, R.S.B. 1, 5 BB; h'i'j (1): 161-49 C; h (13): Rupestris du Lot, 3309 C, 44-53 Ma, 4010 Cl, 99 R, 110 R, 1103 Pa, 1447 Pa, 140 Ru, 5 C, SO4, 125 AA, 8 B; hij (2): 420 A, 34 E.M.. Correspondences with the phenotypes indicated by SUBDEN *et al.* and by PARFITT and ARULSEKAR are proposed.

Dans ces conditions il faut souligner que les différences entre les phénotypes représentant respectivement les génotypes h'h', h'h et hh sont très proches et pour l'instant difficiles à distinguer car la distance séparant les deux allèles h' et h est très faible. Les deux groupes phénotypiques les plus importants h' (8 porte-greffe) et h (13 porte-greffe) indiqués ici ne constituent donc que des propositions résultant de nos observations mais il est possible qu'en réalité ils correspondent à trois catégories de génotypes différents. On peut remarquer que tous les 'Rupestris-Berlandieri' se retrouvent dans le même groupe, ce qui est à mettre en parallèle avec les proximités respectives entre ces génotypes. En ce qui concerne le Fercal résultant d'un croisement de BC N° 1 par 333 E.M. (POUGET et OTTENWALTER 1983) on peut remarquer que pour le système étudié, ce porte-greffe est hétérozygote (aj) mais que l'on ne retrouve pas d'allèle commun avec le 333 EM (également hétérozygote: fh) comme cela devrait être le cas. Cette constatation soulève le problème de la justesse de l'interprétation génétique proposée ou bien de la réelle généalogie du Fercal. Des études complémentaires seront nécessaires pour venir préciser ce point particulier.

Les résultats encourageants que nous avons obtenus montrent que ces travaux doivent être poursuivis car il semble bien que des différences assez nettes puissent être observées sur ce type de matériel végétal — racines et sarments — entre les variétés de porte-greffe et ce, grâce à une technique relativement simple et peu onéreuse. Il faut en particulier continuer à étudier, pour un porte-greffe donné, l'influence de différents facteurs (assemblage avec divers greffons, état sanitaire, viroses, age, milieu, type de sol) afin de bien s'assurer de la stabilité des résultats observés. La généralisation de cette méthode pourra être envisagée après ces études.

Références

- ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.; 1986: Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. *HortScience* **21**, 928—933.
- CALO, A.; COSTACURTA, A.; PALUDETTI, G.; CALO, G.; ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.; 1989: The use of isozyme markers to characterize grape cultivars. *Riv. Viticolt. Enol.* **42**, 15—22.
- PALUDETTI, G.; CALO, G.; 1988: Elettroforesi di estratti enzimatici in *Vitis* sp.: Nota metodologica. *Riv. Viticolt. Enol.* **41**, 365—374.
- PARFITT, D. E.; ARULSEKAR, S.; 1989: Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **114**, 486—491.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J.; 1987: Manuel Technique de Génétique par Electrophorèse des Protéines. Ed. Lavoisier, Paris.
- POUGET, R.; OTTENWALTER, M.; 1983: Fercal: Nouvelle variété de porte-greffe résistante à la chlorose calcaire. *Prog. Agric. Vitic.* **100**, 220—225.
- SCHWENNESEN, J.; MIELKE, E. A.; WOLFE, W. H.; 1982: Identification of seedless table grape cultivars and a bud sport with berry isozymes. *HortScience* **17**, 366—368.
- SUBDEN, R. E.; KRIZUS, A.; LOUGHEED, S. C.; CAREY, K.; 1987: Isozyme characterization of *Vitis* species and some cultivars. *Amer. J. Enol. Viticult.* **38**, 176—181.
- WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I.; MARTENS, M.-H.; 1988: Genetic analysis of isozyme polymorphism in Grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **113**, 765—769.
- WOLFE, W. H.; 1976: Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *Amer. J. Enol. Viticult.* **27**, 68—73.

Reçu le 23. 3. 1992

Correspondance à:

J. M. BOURSQUOT
Chaire de Viticulture
E.N.S.A.
Place Viala
F-34060 Montpellier Cedex 1
France