

Laboratoire des Sciences de la Vigne, Université de Bourgogne, Dijon, France

**Caractérisation biochimique des cépages de *Vitis vinifera* L.
par électrophorèse d'isoenzymes foliaires:
Essai de classification des variétés**

par

M. BENIN, J. GASQUEZ¹⁾, A. MAHFOUDI²⁾ et R. BESSIS

**Biochemical characterization of *Vitis vinifera* L. cultivars by electrophoresis of leaf
isoenzymes:
An attempt to classify grapevine varieties**

S u m m a r y : A number of 40 *Vitis vinifera* varieties commonly grown in France could be characterized by disc-electrophoresis of isoenzymes. Starting from forced cuttings, this technique allows to analyze a large number of plants at any time of the year; only low quantities of leaf material are needed and no enzyme purification is necessary. Among 39 bands identified from 3 enzyme systems, 31 were variable: 19, 8 and 4 isoenzymes, respectively, of α -esterase (α -EST), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and acid phosphatase (PHA).

Combinations of these bands allowed to characterize each variety. 13 groups of related varieties could be established by multivariate analysis of the presence versus absence of bands. The 7 best characterized groups gather varieties which, according to ampelographic classification, are grouped in the same way. The interrelations between isoenzymes and certain ampelographic characters or the presumed geographic origin of the varieties allow to propose a statistical interpretation of the enzymatic classification.

Key words : ampelography, variety of vine, leaf, enzyme, protein, analysis, statistics.

Introduction

L'ampélographie classique, qui a aujourd'hui près d'un siècle d'existence (VIALA et VERMOREL 1901—1910; GALET 1956-1964), demeure encore la seule méthode reconnue et éprouvée de reconnaissance et de classification des espèces et variétés de vigne. Or cette science comporte une partie descriptive importante, basée sur l'appréciation visuelle de certains caractères phénotypiques (couleur, aspect, forme...) des organes de la plante (bourgeon, feuille, baie...), qui peuvent être fortement variables sous l'influence des facteurs de l'environnement.

Ce n'est pas le cas des isoenzymes, qui sont les produits de l'expression directe du génôme. SCHAEFER (1969) propose une technique d'extraction et d'électrophorèse des protéines de feuilles prélevées au vignoble, qui lui permet de mettre en évidence une grande variabilité entre les zymogrammes des peroxydases (SCHAEFER 1970), puis des phosphatases acides, des estérases et des phénoloxydases de 20 espèces et hybrides de *Vitis* (SCHAEFER 1971 a et d). Il montre d'autre part qu'il existe une certaine hétérogénéité des isoenzymes peroxydasiques et des protéines le long de la pousse et selon le stade de développement des feuilles provenant du vignoble (SCHAEFER 1971 b et c).

Différentes techniques électrophorétiques ont permis d'identifier quelques variétés

¹⁾ Laboratoire de Malherbologie, INRA, Dijon, France.

²⁾ Laboratoire d'Informatique, Université de Bourgogne, Dijon, France.

de vigne à partir de baies mûres (DRAWERT et GÖRG 1974; WOLFE 1976, 1977; SCHWENNESEN *et al.* 1982), de feuilles (DAL BELIN PERUFFO *et al.* 1981), de pollen (AHMEDULLAH et WOLFE 1981; STAVRAKAKIS et LOUKAS 1983).

Nous proposons dans ce travail une méthode simple et rapide, qui nous a permis de caractériser sans ambiguïté quelques-uns des cépages de *Vitis vinifera* L. cultivés en France, et cela à partir d'extraits foliaires issus de boutures poussant dans des conditions stables et parfaitement contrôlées. Par ailleurs, l'exploitation statistique des résultats par analyse multivariée nous permet d'aborder une approche nouvelle de la diagnose biochimique des cépages.

Matériel et méthodes

Un ensemble de clones de 42 variétés de *Vitis vinifera* L. à raisin de table ou de cuve blanc, gris, noir ou rouge teinturier, a été choisi. Ces cépages provenaient des collections du CIB de Beaune pour les Pinots (Echevronne) et les Chardonnays, Melons et Aligotés (Mont Battois) de la SICAREX du Beaujolais (Villefranche/Saône) et du SUAD de Blois (Pontlevoy) pour les Gamays, enfin de l'ANTAV du Grau-du-Roi (Espiguettes) pour tous les autres. Des bois de taille, prélevés au vignoble en Décembre 1984/Janvier 1985 et stockés au minimum 1 mois à 4 °C, de façon à lever la dormance des bourgeons, ont été découpés en boutures à 2 yeux. Ces boutures ligneuses sont ensuite forcées en pots sur tourbe/perlite (1/1) dans une chambre de culture à 25 °C, 55 % d'humidité relative en moyenne, et 16 h de jour / 8 h de nuit. Les plantes, arrosées à la solution nutritive dès leur enracinement au bout d'un mois 1/2 environ, peuvent être entretenues ainsi plusieurs mois et éventuellement taillées pour redonner rapidement de nouvelles pousses avec des feuilles en bon état sanitaire et physiologique. De jeunes feuilles étalées, de rang 3 à 5 à partir de l'apex (SCHAEFER 1971 c), prélevées sur les pousses en croissance, sont utilisées pour réaliser les extraits protéiques.

L'extraction des protéines solubles est réalisée dans le tampon proposé par SCHAEFER (1971 d). 80 à 100 mg de feuilles fraîches sont broyées finement au mortier en présence de sable dans 500 µl de tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, contenant 0,2 % d'acide ascorbique, 0,2 % d'EDTA-Na₂, 0,38 % de tétraborate disodique, 0,36 % de NaCl, 5 % de PEG 20 000 et 2,5 % de thioglycolate de Na, complétés par du Polyclar AT (polyvinylpyrrolidone) activé à l'HCl, à raison de 30 à 50 % du poids de feuilles. Les broyats sont ensuite centrifugés à 4 °C pendant 20 min à 10 000 g. 40 µl de surnageant sont utilisés directement pour l'électrophorèse.

La technique employée est celle décrite par ORNSTEIN (1964) et DAVIS (1964), modifiée par GASQUEZ et COMPOINT (1977). Il s'agit d'une électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide en système discontinu (disc-électrophorèse). Les gels de séparation et de parois contiennent 9 % d'acrylamide à pH 8,9, le gel de concentration 2,5 % à pH 6,7. Un tampon Tris-glycine 7 mM de pH 8,3 sert de tampon de migration. L'électrophorèse est conduite à ampérage constant et à basse température avec un générateur de courant pulsé pendant environ 2 h 30 (GASQUEZ et COMPOINT 1977).

Pour les 3 systèmes isoenzymatiques retenus, les méthodes de révélation par réaction colorée sont celles décrites par BREWER et SING (1970) pour la carboxylestérase (α -EST) avec l' α -naphtyl acétate comme substrat, et par VALLEJOS (1983) pour la phosphatase acide (PHA) et la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT).

Deux à trois répétitions par variété et par enzyme ont été effectuées en 1985 et 1986, afin de s'assurer de la reproductibilité des profils isoenzymatiques.

Une analyse factorielle des correspondances multiples (AFCM) à partir des présence/absence des isoenzymes par variété, nous a permis d'obtenir le positionnement

relatif par projection sur différents plans, des modalités des variables (présence ou absence de chaque bande-isoenzyme détectée) et des individus (cépages) les uns par rapport aux autres. Cette représentation graphique permet donc de visualiser les liens pouvant exister entre les variétés étudiées sur la base de ces critères biochimiques.

Le programme d'analyse factorielle «Qualita» conçu par MAHFOUDI (1985) nous a permis d'autre part, sans transformation préalable des données, d'évaluer les dépendances entre les variables qualitatives (isoenzymes) et leur classement par importance des liaisons. Par la même méthode, nous avons cherché à mettre en évidence une relation entre ces marqueurs isoenzymatiques et certains paramètres ampélographiques caractéristiques des variétés étudiées, définis par GALET (1957—64):

- rapports entre les nervures (A, B et C)
- rapport longueur totale/largeur totale de la feuille (r)
- sommes des angles intervenaires (σ et Σ)
- profondeur des sinus latéraux inférieurs (SI) et supérieurs (SS)
- forme du sinus pétiolaire
- villosité du bourgeonnement
- villosité des feuilles adultes
- type de feuille
- taille des dents de la feuille adulte
- forme des dents de la feuille adulte
- couleur des baies
- caractère «teinturier» des baies
- origine géographique présumée

Résultats et discussion

Identification des cépages

L'extraction d'enzymes natives est rendue délicate par la présence en quantité importante dans les tissus de vigne et en particulier dans les feuilles, de produits phénoliques du type ortho-diphénols et tanins. Ceux-ci inactivent et précipitent les enzymes en se complexant avec elles et en s'oxydant au moment du broyage (LOOMIS et BATAILLE 1966; ANDERSON 1968). L'emploi du milieu d'extraction proposé par SCHAEFER (1971 d), modifié par l'addition de PVP insoluble activé à l'HCl comme adsorbant des phénols et de thioglycolate de Na comme protecteur des groupements sulfhydryls de la protéine, a donné les meilleurs résultats.

Parmi 12 systèmes isoenzymatiques différents testés, les 3 enzymes présentant le plus fort potentiel de variation et la meilleure lisibilité des gels dans nos conditions d'expérience (Fig. 1) ont été retenus comme marqueurs de variabilité: une estérase, la carboxyl estérase ou alpha-estérase (α -EST, E.C.3.1.1.1), la phosphatase acide (PHA, E.C.3.1.3.2), et une transférase, la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT, E.C.2.6.1.1). Ainsi, 39 bandes différentes au total (24 en EST, 9 en GOT et 6 en PHA) ont été révélées pour les 3 enzymes sur l'ensemble des cépages analysés. Ces bandes totales représentent pour chaque enzyme considéré les «zymogrammes synthétiques» (ZS) caractéristiques de *V. vinifera* (Fig. 2). On dénombre quelques bandes constantes (BC) présentes chez toutes les variétés, donc sans intérêt particulier: 5 en α -EST, 1 en GOT et 2 en PHA (Fig. 2). Ces 3 systèmes isoenzymatiques foliaires, dont plus de 79 % des bandes sont variables (BV), peuvent donc être considérés comme d'excellents marqueurs de la variabilité intervariétale chez *V. vinifera*. D'autres auteurs arrivent à cette même conclusion pour la PHA des baies (WOLFE 1976; SCHWENNESEN *et al.* 1982) ou des feuilles (SCHAEFER 1971 a), pour l'EST pollinique (STAVRAKAKIS et LOUKAS 1983) ou

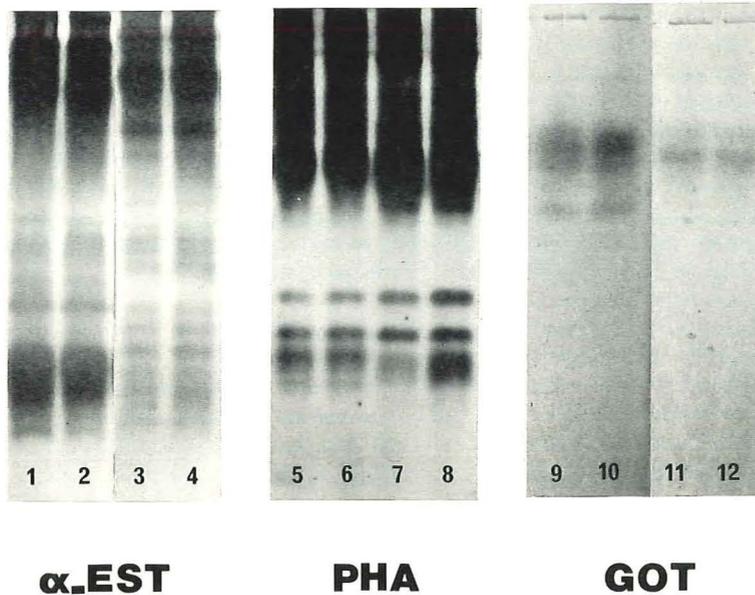


Fig. 1: Exemple des profils électrophorétiques obtenus pour les trois systèmes isozymiques α -estérase (α -EST), glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) et phosphatase acide (PHA) chez *Vitis vinifera* L.. 1, 2, 5, 6, 9, 10: Pinot noir; 3, 4, 7, 8: Cabernet Sauvignon; 11, 12: Chardonnay.

Example of the enzyme patterns obtained for the three isoenzyme systems α -esterase (α -EST), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and acid phosphatase (PHA) of *Vitis vinifera* L.. 1, 2, 5, 6, 9, 10: Pinot noir; 3, 4, 7, 8: Cabernet Sauvignon; 11, 12: Chardonnay.

foliaire (SCHAEFER 1971 a; DAL BELIN PERUFFO *et al.* 1981) et pour la GOT des grains de raisin (WOLFE 1977). Cependant, tous les travaux ont été réalisés sur du matériel provenant du vignoble et donc susceptible d'être plus sensible aux variations du milieu.

Le Tableau 1 regroupe l'ensemble des profils électrophorétiques obtenus pour les 42 variétés analysées. Certaines bandes rares peuvent caractériser un cépage, par exemple A0 qui n'existe que chez le Tannat (TAN), ou une famille de cépages, par exemple B8, présente seulement chez les Gamays et aussi chez le Cabernet-Franc (CAF) et le Merlot (MER). De même, les bandes très fréquentes permettent, par leur absence, d'apparenter ou d'identifier certaines variétés comme, par exemple, les 2 cépages savoyards Roussane (ROU) et Marsanne (MAR), seuls à ne pas avoir B1 et B2 simultanément, ou encore l'Ugni Blanc (UGN), que l'on peut facilement reconnaître par l'absence de la bande G5.

Nous nous sommes intéressés, par ailleurs, à la relation pouvant exister entre des variations phénotypiques connues pour être d'origine mutationnelle chez certains cépages et les profils isoenzymatiques de ces mêmes variétés. Ainsi, chez les Pinots, d'importants changements morphologiques par rapport au type parental PIN, tels que l'absence de pruine sur la pellicule de la baie (PTN), un feuillage extrêmement découpé (PIL) et un tomentum très abondant (MEU), ou chez les Gamays, une différence notable de la forme et de la découpe de la feuille de GAB et GAC par rapport au GAN (GALET 1958), ne s'accompagnent pas forcément de différences entre les zymogrammes. A l'inverse, des cépages ampélographiquement semblables (GALET 1958), et qui diffè-

rent seulement par le caractère couleur de la pellicule (Pinots noir, gris et blanc), ou de la pulpe (Gamays noir et Fréaux; Pinot noir et teinturier) peuvent être aisément distingués entre eux par leur zymogramme.

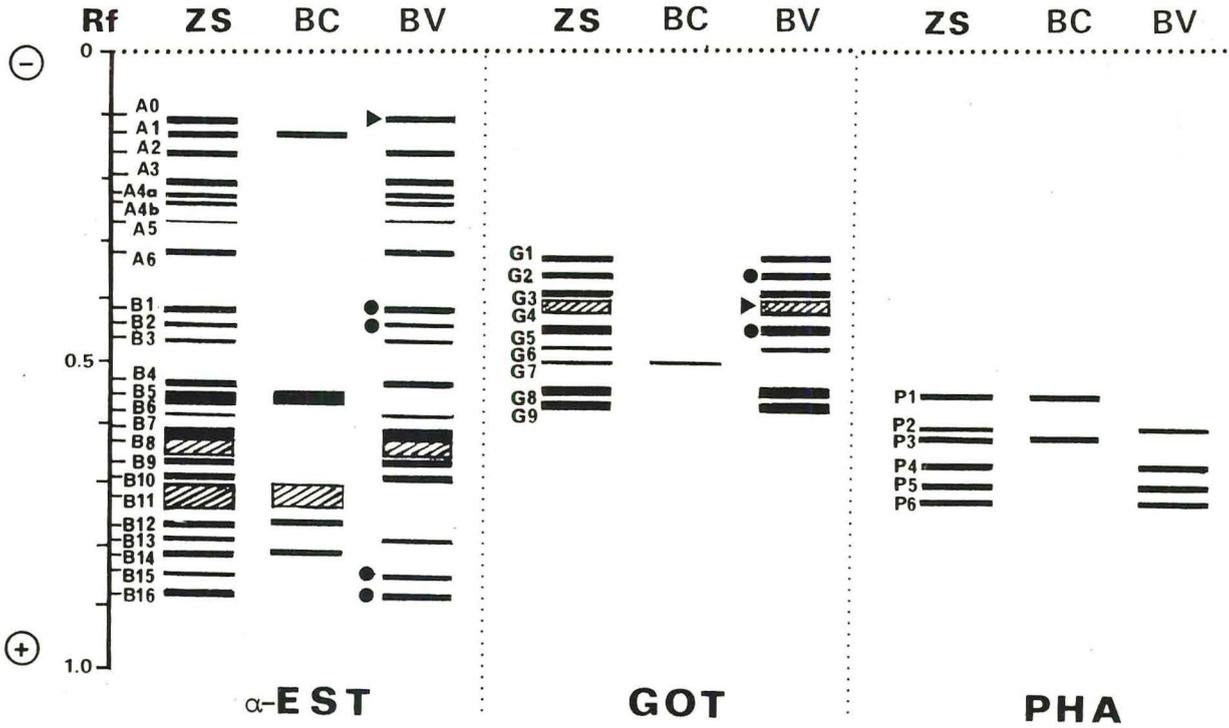


Fig. 2: Représentation schématique des zymogrammes d' α -esterase (α -EST), de glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et de phosphatase acide (PHA) chez différentes variétés de *Vitis vinifera* L. Rf=Front de référence; ZS=zymogramme synthétique; BC=bandes constantes; BV=bandes variables; \blacktriangleright =bandes rares (fréquence $\leq 10\%$); \bullet =bandes fréquentes (fréquence $> 10\%$).
 Schematic representation of α -esterase (EST), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and acid phosphatase (PHA) banding patterns for different *Vitis vinifera* L. varieties. Rf=Reference front; ZS=synthetic isoenzyme banding pattern; BC=constant bands; BV=variable bands; \blacktriangleright =rare bands (frequency $\leq 10\%$); \bullet =frequent bands (frequency $> 10\%$).

Tableau 1

Tableau des présences (+)/absences (-) des isoenzymes variables des α -EST, GOT et PHA chez 42 variétés de *Vitis vinifera* L. B = Blanc; G = gris; N = noir; T = teinturier.

N°	CODE	VARIETES	α -EST											
			A0	A2	A3	A4a	A4b	A5	A6	B1	B2	B3	B4	
1	CHA	Chardonnay (B)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
2	MEL	Melon (B)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
3	PIN	Pinot noir (N)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
4	PIG	Pinot gris (G)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
5	PIB	Pinot blanc (B)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
6	PTN	Pinot tête de nègre (N)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
7	PIT	Pinot teinturier (NT)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
8	PIL	Pinot lacinié (N)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
9	MEU	Meunier (N)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
10	ALG	Aligoté (B)	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	
11	GAN	Gamay noir (N)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	
12	GAC	Gamay de Chaudennay (NT)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	
13	GAF	Gamay Fréaux (NT)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	
14	GAB	Gamay de Bouze (NT)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	
15	MER	Merlot noir (N)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
16	CAB	Cabernet Sauvignon (N)	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	
17	CAF	Cabernet franc (N)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
18	VER	Petit Verdot (N)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
19	CHE	Chenin (B)	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
20	COT	Cot (N)	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
21	COL	Colombard (B)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
22	GRE	Grenache noir (N)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
23	CAR	Carignan (N)	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
24	CIN	Cinsaut (N)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	
25	MOU	Mourvèdre (N)	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	
26	ALI	Alicante H.Bouschet (NT)	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
27	LIS	Listan (B)	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
28	UGN	Ugni blanc (B)	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
29	MAC	Maccabeu (B)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
30	PIQ	Piquepoul (B)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
31	CLA	Clairette (B)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
32	VIO	Viognier (B)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
33	SYR	Syrah (N)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
34	GMA	Gros Manseng (B)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
35	TAN	Tannat (N)	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	
36	MAR	Marsanne (B)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	
37	ROU	Roussane (B)	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
38	JAQ	Jacquère (B)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
39	NEG	Négrette (N)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
40	MUA	Muscat d'Alexandrie (B)	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
41	MUG	Muscat à petits grains (B)	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
42	CHS	Chasselas (B)	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
		FREQUENCE DES ISOZYMES (en %)	2	45	36	83	50	74	24	93	93	79	79	

Presence (+)/absence (-) of α -EST, GOT and PHA variable isoenzymes for 42 *Vitis vinifera* L. varieties. B=White; G=grey; N=black; T=red juice.

α -EST								GOT									PHA				N°
B6	B7	B8	B9	B10	B13	B15	B16	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G8	G9	P2	P4	P5	P6		
-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	1
-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	2
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	3
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	4
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	5
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	6
-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	7
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	8
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	9
-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	10
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	11
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	12
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	13
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	14
+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	15
+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	16
+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	17
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	18
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	19
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	20
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	21
+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	22
+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	23
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	24
-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	25
+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	26
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	27
+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	28
+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	29
-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	30
-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	31
-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	32
+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	33
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	34
-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	35
+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	36
-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	37
+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	38
-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	39
+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	40
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	41
+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	42
74	71	14	81	43	62	90	90	29	93	81	7	98	67	36	64	21	88	69	43		

Analyses multidimensionnelles

La Fig. 3 représente le positionnement des 42 cépages dans le plan défini par les axes factoriels 1 (horizontal) et 2 (vertical) obtenu par AFCM du Tableau 1 des présences/absences des bandes-isoenzymes variables, la bande A0, trop rare, ayant été supprimée. Le pourcentage d'inertie cumulé de ces 2 premiers axes atteint 27,6 %. L'étude des proximités entre les différentes variétés a été suivie sur les 6 plans définis à partir des 4 premiers axes factoriels qui expliquent près de 50 % de la variance totale. Ainsi, nous avons pu former 13 groupes de cépages isoenzymatiquement proches, qui s'individualisent et restent homogènes dans ces 6 premiers plans factoriels. Les cépages qui

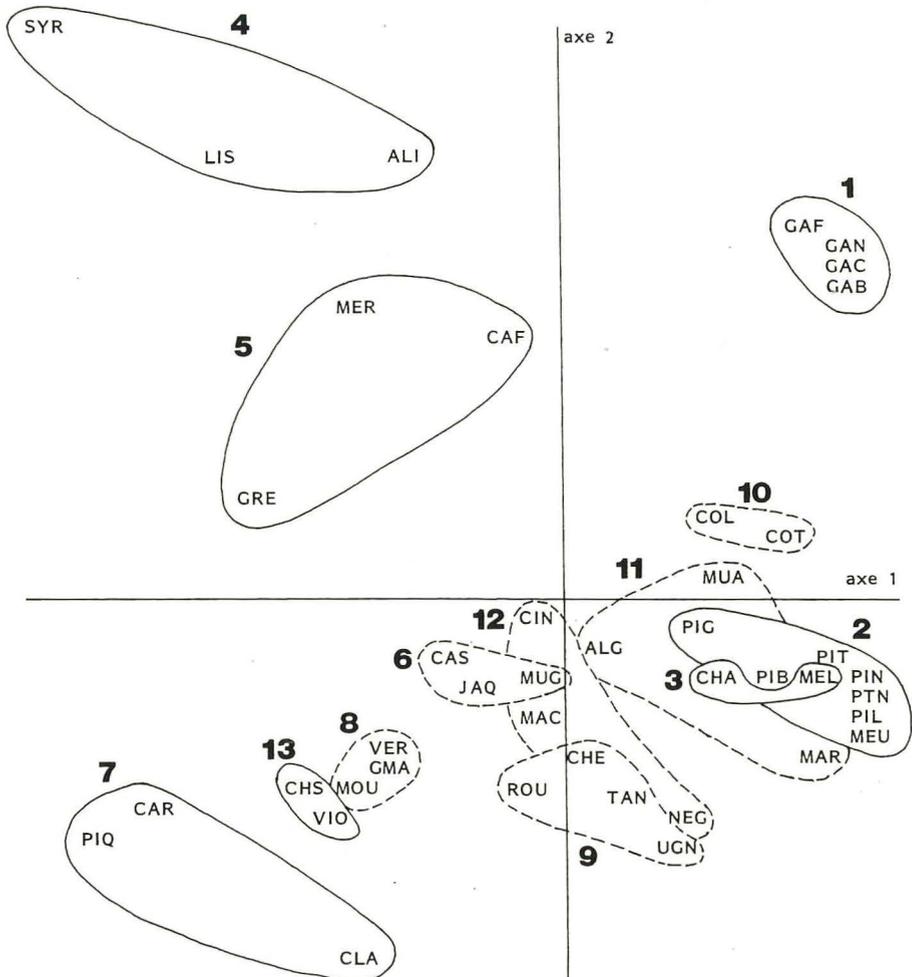


Fig. 3: Positionnement en analyse factorielle des correspondances multiples (AFCM) de 42 cépages de *Vitis vinifera* L. dans le plan des axes factoriels 1 (axe horizontal) et 2 (axe vertical).

Factorial analysis of multiple correspondances (FAMC): position of 42 *Vitis vinifera* L. varieties in factorial axis 1 (horizontal axis) and 2 (vertical axis) plane.

possèdent des zymogrammes peu discriminants (bandes très répandues) et dont les projections se séparent peu, en restant groupés autour de l'origine, des axes ont été volontairement écartés (groupes 6, 8, 9, 10, 11, 12, en pointillés sur la Fig. 3). Nous n'avons donc cherché à interpréter que les groupes 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 13, qui sont les mieux séparés et les plus excentrés dans l'ensemble des plans considérés.

L'étude préalable de la matrice des probabilités de liaison entre les variables/isoenzymes fournie par «Qualita» (MAHFOUDI 1985) a relevé l'existence d'isoenzymes fortement corrélés entre eux. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence en GOT deux systèmes de bandes de type «strictement exclusif» (probabilité de liaison égale à 1), caractérisées par le fait que, chez tous les cépages étudiés, la présence (absence) de l'une exclut la présence (absence) de l'autre. Il s'agit des bandes appariées G2—G4 et G8—G9. D'autres systèmes comme A5—A6, B3—B8/P2—B7, A3—B13, ou encore A4b—B10, se composent de bandes très fortement liées avec une probabilité de liaison supérieure à 95 %. Lorsque ces dépendances concernent des isoenzymes d'un même enzyme, très voisins sur le gel d'électrophorèse, il pourrait s'agir d'un locus en α -EST (A5—A6), et probablement de 2 loci en GOT (G8—G9 et G2—G4) chacun à 2 allèles codominants, tout au moins chez les variétés étudiées. Par contre, dans le cas de bandes plus éloignées, appartenant au même système isozymique, comme A3—B13, A4b—B10 ou B3—B8 en α -EST ou même d'isoenzymes de 2 protéines différentes (P2—B7), il pourrait s'agir de loci liés et/ou d'une simple coïncidence. Seule une étude de la descendance des plantes autofécondées, présentant ces isoenzymes particuliers, pourrait confirmer ou infirmer ces hypothèses.

La Fig. 4, qui représente le positionnement (AFCM) limité aux modalités (absence ou présence) des variables/isoenzymes les plus corrélées aux axes factoriels 1 et 2, illustre bien l'existence de telles liaisons entre bandes. D'autre part, elle indique quels sont les isoenzymes les plus explicatifs des axes qui définissent le plan factoriel de représentation. Ainsi, les bandes G8—G9, A4b, A3 et, dans une moindre mesure, B10 et B13, séparent les variétés selon l'axe horizontal (axe 1), et les bandes G2, G4, B3, B8, puis G3, A5, B7, A6 et P2, selon l'axe vertical (axe 2). La composition isozymique des variétés constituant chaque groupe de proximité formé vis-à-vis de ces bandes «déterminantes» peut être visualisée sur le Tableau 2, qui laisse apparaître la difficulté de séparation des groupes trop proches des axes et de l'origine (6, 8, 9, 10, 11 et 12).

L'analyse des dépendances par «Qualita» entre ces isoenzymes et les critères ampélographiques retenus des cépages étudiés a montré que:

— les variables explicatives de l'axe 1, A4b et B13 sont significativement corrélées au seuil de 99 % à l'origine géographique la plus probable des variétés, qui se répartissent ainsi, globalement, du Sud vers le Nord (Fig. 3). On trouve ainsi, de gauche à droite, par projection sur l'axe 1, le groupe des cépages espagnols (LIS, GRE, CAR, MOU) et languedociens (PIQ, CLA), puis les variétés originaires d'Aquitaine (MER, CAF, CAS, VER) et béarnaises (GMA, TAN, NEG), suivies des cépages savoyards (JAQ, ROU, MAR), et enfin des Noiriens (Gamays, Pinots, CHA, MEL). Quelques cépages d'origine inconnue ou très controversée, comme SYR, CHS, MAC, COT ou UGN, ainsi que les représentants de variétés provençales (CIN, MUG) ou proche-orientales (MUA), ne semblent cependant pas suivre cette répartition selon le gradient Nord-Sud.

— toutes les variables/isoenzymes définissant l'axe 2, à l'exception de G3, sont très significativement corrélées, au seuil de 99 ou 100 %, à certains paramètres ampélographiques descripteurs de l'architecture foliaire et du phénotype «couleur de la baie» des cépages avec lesquels elles ont été mises en relation. Ainsi, en ne considérant que les groupes significatifs, les variétés situées au-dessus de l'axe 1 sont en majorité à raisin noir (9 cas sur 10) et possèdent plutôt des feuilles à dents anguleuses (6 cas sur 10) et dont la somme des angles entre les 4 nervures principales (Σ) n'excède pas 150°, d'où

un sinus pétiolaire assez ouvert (GALET 1985). En revanche, au-dessous de l'axe 1 et sur l'ensemble des cépages analysés, se trouvent la plupart des cépages blancs (16 sur 19 au total) et, pour les groupes significatifs seulement, des variétés à feuilles aux dents ogivales (12 cas sur 14) et à Σ qui peut facilement dépasser 150° (sinus pétiolaire fermé ou à bords superposés).

On pourrait donc supposer que quelques-uns des gènes impliqués dans la synthèse (ou l'expression) des isoenzymes aient pu subir une certaine pression de sélection sous l'influence de l'isolement géographique ou de facteurs édaphiques et climatiques particuliers. Le gain sélectif ainsi acquis, par suite d'un certain avantage au niveau métabolique et physiologique, dont les modalités restent à préciser, se traduirait par l'apparition ou la disparition d'un ou plusieurs électromorphes, permettant de caractériser spécifiquement un groupe de variétés donné, ayant évolué au cours des siècles de culture dans le contexte environnemental d'une région donnée.

L'équipement isoenzymatique de l'espèce *V. vinifera* se trouverait ainsi progressivement et qualitativement modifié d'une zone géographique à l'autre, depuis les cépages méditerranéens espagnols jusqu'aux variétés est-septentrionales de la Bourgogne, en passant par les cépages français méridionaux intermédiaires.

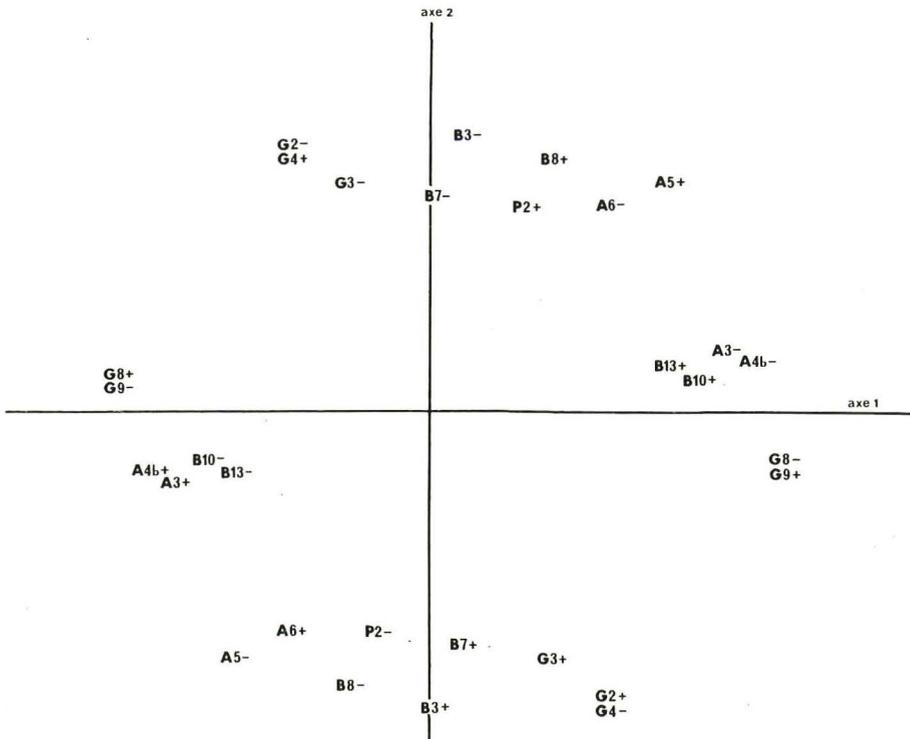


Fig. 4: Positionnement en AFCM des modalités (présence +/absence -) des variables-isoenzymes les plus corrélées aux axes factoriels 1 (horizontal) et 2 (vertical).

FAMC modalités (présence +/absence -): position of the variable isoenzymes with the best correlations to factorial axis 1 (horizontal) and 2 (vertical).

Une interprétation taxonomique plus poussée des liens pouvant exister entre variétés à travers la distribution géographique de leur composition isozymique passe obligatoirement par l'approfondissement de notre connaissance, encore trop sommaire actuellement, de la génétique de la vigne et, notamment, de l'hérédité de ces caractères biochimiques.

Il reste enfin à découvrir la signification biologique des relations de conjonction, purement statistiques, mises en évidence entre marqueurs enzymatiques et caractères morphologiques.

Classification des cépages et groupes géographiques

L'origine, tant génétique qu'historique, de nos cépages cultivés est fort controversée, et les quelques données fragmentaires acquises sur le sujet ont donné lieu à de multiples hypothèses, résumées dans quelques articles de synthèse (LEVADOUX 1948, 1956; RIVES 1971; BOUQUET 1982). Ainsi, les Pinots, par exemple, sont considérés par les ampélographes et les généticiens comme les représentants typiques de ces cépages archaïques indigènes dont les caractéristiques botaniques seraient les plus proches des cépages primitifs. NEGRUL, cité par LEVADOUX (1956), classe les cépages de *V. vinifera* L. en 3 grandes unités taxonomiques ou groupes écologico-géographiques fondamentaux, appelés «*Proles*», qui se caractérisent par l'aire de culture, les caractères ampélographiques et les propriétés biologiques des variétés leur appartenant. Ces 3 classes se subdivisent en sorto-types (cépages voisins), où l'on distingue des sortogroupes (un cépage et ses variations apparues par mutations gemmaires), le cépage étant lui-même composé de différents clones. A la suite de NEGRUL, LEVADOUX (1956) définit des «groupes géographiques» régionaux bien individualisés chez les cépages de *V. vinifera* autochtones qui présentent entre eux une forte convergence morphologique, liée, semble-t-il, à une co-évolution pendant des siècles au sein d'un même isolat géographique. Les cépages étudiés font pour la plupart partie de la *Proles occidentalis* (38 sur 42) qui est la mieux représentée en France. La seule variété appartenant à la *Proles pontica*, la Clairette (CLA), fait partie du groupe 7, mais reste très excentrée par rapport à l'ensemble des cépages. La *P. orientalis* est représentée par 3 variétés (MUA, MUG, CIN), qui se regroupent au centre du nuage, ce qui sous-entend qu'elles sont inclassables par les caractères utilisés; certainement parce-qu'elles se distinguent des groupes constitués plutôt par l'absence de bandes différentielles que par la présence de bandes qui leur seraient propres. Ainsi, les groupes 1, 2 et 3 de la Fig. 3 correspondent au sorto-type du Pinot de la *P. occidentalis* de NEGRUL ou au groupe des Noiriens de LEVADOUX. De plus, les groupes 1 et 2 correspondent respectivement aux sorto-groupes du Gamay et du Pinot. Les autres groupes significatifs issus de l'AFCM, regroupant au plus 2 ou 3 variétés (4, 5, 7 et 13) et dont l'existence sur la base des similitudes isoenzymatiques est indubitable, ne peuvent pas être rapprochés des classifications de LEVADOUX ou de NEGRUL. Ainsi, le groupe 4 (Fig. 3) rassemble le Listan (LIS), l'Alicante H. Bouschet (ALI) et la Syrah (SYR). L'Alicante est un cépage teinturier hybride, créé par HENRI BOUSCHET vers 1870 à partir du Teinturier du Cher, de l'Aramon et du Grenache noir (VIALA et VERMOREL 1905). Or il se situe bien sur notre diagramme (Fig. 3) à mi-distance selon l'axe 1 du groupe des cépages espagnols dont font partie LIS et GRE, et de celui des Noiriens auquel appartient le Teinturier du Cher. LEVADOUX (1956) souligne d'ailleurs que la ressemblance frappante entre la feuille de l'Alicante et celle du Grenache permet d'identifier aisément ce dernier comme géniteur. Il serait intéressant par la suite de comparer son zymogramme avec ceux de ses 3 parents, puisqu'il s'agit d'une des rares variétés cultivées depuis près d'un siècle dont on connaisse l'hérédité exacte. Il se pourrait que la Syrah, que LEVADOUX classe dans la famille des Sérines, ne soit pas

originaires de la vallée du Rhône où elle est connue depuis le 13^e siècle, car elle se trouve très éloignée des cépages autochtones de cette région, comme le Viognier (VIO) ou les variétés savoyardes (ROU, MAR, JAQ) typiques de cette famille.

Le groupe 5 montre que, si le Merlot noir (MER) se rapproche du Cabernet franc (CAF) vraisemblablement bordelais, il est également voisin du Grenache, ce qui pourrait suggérer une origine étrangère du Merlot. Or, nous savons que ce dernier pourrait être d'introduction récente en Aquitaine, puisqu'on n'en trouve pas trace dans la littérature ampélographique avant 1854 (GALET 1985). Dans le groupe 7 se réunissent

Tableau 2

Tableau des présences (+)/absences (-) des variables-isoenzymes les plus corrélées aux axes factoriels 1 et 2 chez les différents groupes variétaux générés par AFCM. B = Blanc; G = gris; N = noir; T = teinturier.

Presence (+)/absence (-) of the variable isoenzymes with the best correlations to factorial axis 1 and 2 for the different varietal groups due to FAMC. B = White; G = grey; N = black; T = red juice.

N°	CODE	GROUPE	VARIETES	AXE 1					AXE 2					N°						
				G8	G9	A4b	A3	B10	B13	G2	G4	B3	B8		A5	G3	A6	B7	P2	
11	GAN	1	Gamay noir (N) Gamay de Chaudennay (NT) Gamay Fréaux (NT) Gamay de Bouze (NT)	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	11		
12	GAC			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	12	
13	GAF			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	13	
14	GAB			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	14	
3	PIN	2	Pinot noir (N) Pinot gris (G) Pinot blanc (B) Pinot tête de nègre (N) Pinot teinturier (NT) Pinot laciné (N) Meunier (N)	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	3		
4	FIG			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	4	
5	PIB			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	5	
6	PIN			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	6	
7	PIT			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	7	
8	PLI			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	8	
9	MEU			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	9	
1	CHA			3	Chardonnay (B) Melon (B)	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	1
2	MEL					-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
10	ALG	11	Aligoté (B) Marsanne (B) Muscat d'Alexandrie (B)	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	10		
36	MAR			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	36	
40	MUA			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	40	
20	COT	10	Cot (N) Colombard (B)	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	20		
21	COL			-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	21	

En ce qui concerne les 18 cépages non classables par l'analyse isoenzymatique des 3 enzymes étudiés et situés au centre de la représentation dans les groupes en pointillés (Fig. 3), les associations issues de l'AFCM regroupent des cépages qui n'ont, outre leur zymogramme, que peu de points communs, tant au niveau ampélographique que de par leur origine géographique, ce qui ne permet en aucun cas de les comparer aux classifications déjà existantes. Il conviendrait, dans le cas de ces variétés particulières, d'envisager l'étude de nouveaux enzymes, susceptibles d'être plus discriminants, ou de se contenter du classement relativement incomplet, comme le souligne LEVADOUX (1956), basé sur les homologues morphologiques. Ce point illustre bien les limites de notre méthode, non pas vis-à-vis de l'identification précise des cépages, qui reste acquise, mais plutôt de la mise en évidence de liens phylogéniques entre les variétés de *V. vinifera* à travers la présence d'isoenzymes communs.

Conclusion

Nos résultats confirment donc la validité du choix des isoenzymes comme outils de reconnaissance des cultivars chez la vigne, conformément aux travaux antérieurs déjà cités. De plus, notre méthode présente l'intérêt majeur de pouvoir analyser à tout moment de l'année toute variété dont on a prélevé un peu de bois de taille. Les feuilles ainsi obtenues sont disponibles autant de fois que nécessaire sur la même pousse ou sur une nouvelle tige feuillée, produite à la demande par simple retaille de la bouture initiale, l'expérience ayant montré que les zymogrammes obtenus à partir de ces pousses «rafraîchies» étaient identiques à ceux réalisés sur la première tige. D'autre part, l'obtention du matériel végétal en conditions rigoureusement homogènes et contrôlées offre l'avantage considérable de minimiser la part de variabilité liée à l'environnement des plantes. Enfin, l'analyse statistique multidimensionnelle des résultats nous a permis de discuter par une voie nouvelle certaines hypothèses déjà anciennes concernant la classification des cépages de *V. vinifera* L. et basées sur la seule observation de convergences morphologiques entre variétés. Notre approche isoenzymatique de la taxonomie variétale chez la vigne montre que certains cépages bien représentés dans notre étude (Pinots, Gamays) se séparent en groupes en tout point superposables à ceux des classifications antérieures. D'autres, peu représentés ou trop différents ampélographiquement, se séparent mal ou se rassemblent en groupes difficiles à interpréter et ne correspondant pas au classement plus ou moins admis jusqu'ici. L'étude d'un plus grand nombre de variétés chez les familles de cépages trop peu représentées et de marqueurs isoenzymatiques supplémentaires chez les cépages actuellement inclassables par notre méthode, devrait permettre d'affiner notre classification en la rendant plus résolutive.

Résumé

Une quarantaine de cépages de *Vitis vinifera* L. cultivés en France ont pu être caractérisés spécifiquement d'après les zymogrammes des trois systèmes isoenzymatiques α -estérases (α -EST), glutamate-oxaloacétate transaminases (GOT) et phosphatases acides (PHA), qui présentent 79 % de bandes variables (respectivement 19, 8 et 4). La technique utilisée permet d'analyser rapidement et à tout moment de l'année, un grand nombre de plantes à partir de faibles quantités de tissu foliaire, sans purification préalable des enzymes. Les proximités entre les différentes variétés et les associations

qui en résultent sont visualisées par analyse multidimensionnelle des présences/absences des isoenzymes variables. L'étude des dépendances existant entre les isoenzymes et certains caractères ampélographiques ou l'origine géographique probable des cépages étudiés permet de proposer une interprétation des groupes statistiques fournis par la diagnose biochimique.

Bibliographie

- AHMEDULLAH, M.; WOLFE, W. H.; 1981: Starch gel electrophoresis of grape pollen. *HortScience* **16**, 426.
- ANDERSON, J. W.; 1968: Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* **7**, 1973-1988.
- BOUQUET, A.; 1982: Origine et évolution de l'encépagement français à travers les siècles. *Progr. Agric. Vitic.* **5**, 110-120.
- BREWER, J.; SING, C. F.; 1970: *An Introduction to Isozymes Techniques*, 86-88. Academic Press, New York, London.
- DAL BELIN PERUFFO, A.; VARANINI, Z.; MAGGIONI, A.; 1981: Caratterizzazione di specie, varietà e cloni di vite mediante elettrofocalizzazione di estratti enzimatici fogliari. C.R. 3^e Symp. Intern. Sélection Clonale de la Vigne, Venise, 8-12 Juin 81, 31-40.
- DAVIS, B. J.; 1964: Disc-electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- DRAWERT, F.; GÖRG, A.; 1974: Über die elektrophoretische Differenzierung und Klassifizierung von Proteinen. III. Disk-Elektrophorese und isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen von Proteinen und Enzymen aus Trauben verschiedener Rebsorten. *Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsch.* **154**, 328-338.
- GALET, P.; 1956-1964: *Cépages et Vignobles de France*. 4 tomes. Imprimerie Déhan, Montpellier.
- — ; 1985: *Précis d'Ampélographie Pratique*. 5^e édition. Imprimerie Déhan, Montpellier.
- GASQUEZ, J.; COMPOINT, J. P.; 1977: Mise en évidence de la variabilité génétique intra-population par l'utilisation d'isoenzymes foliaires chez *Echinochloa crusgalli* L., P. P. *Ann. Amélior. Plantes* **27**, 267-278.
- LEVADOUX, L.; 1948: Les cépages à raisin de cuve. *Progr. Agric. Vitic.* **129**, 6-14.
- — ; 1956: Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. *Ann. Amélior. Plantes* **6**, 59-117.
- LOOMIS, W. D.; 1969: Removal of phenolic compounds from plants. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N.O. (Eds.): *Methods in Enzymology*. Vol. XIII, 555-563. Academic Press, New York, London.
- — ; BATAILLE, J.; 1966: Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* **5**, 423-438.
- MAHFOUDI, A.; 1985: *Qualita: Fondements et Utilisation*. Publication L.A.A.S./C.N.R.S., Toulouse.
- ORNSTEIN, L.; 1964: Disc-electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 321-344.
- RIVES, M.; 1971: Ampélographie. In: RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. (Eds.): *Sciences et Techniques de la Vigne. Traité d'Ampélogie*. Tome I, 131-170. Dunod, Paris.
- SCHAEFER, H.; 1969: Untersuchungen zur Methodik der Extraktion und Disk-Elektrophorese der Blatteiweiße der Gattung *Vitis*. *Wein Wiss.* **24**, 205-232.
- — ; 1970: Über die Isolierung und Disk-Elektrophorese der Isoenzyme der Peroxydase aus den Blättern der Gattung *Vitis*. *Wein Wiss.* **25**, 277-282.
- — ; 1971 a: Enzypolymorphismus in Rebenblättern. *Phytochemistry* **10**, 2601-2607.
- — ; 1971 b: Vergleichende disk-elektrophoretische Untersuchungen über die Eiweiße der Blätter und Triebspitzen der Gattung *Vitis*. *Wein Wiss.* **26**, 57-74.
- — ; 1971 c: Vergleichende Untersuchungen über das Auftreten von Isoenzymen der Peroxydase in den Blättern und Triebspitzen der Rebe. *Wein Wiss.* **26**, 112-134.
- — ; 1971 d: Disk-elektrophoretischer Nachweis der Polyphenoloxidasen aus Rebenblättern. *Vitis* **10**, 31-32.
- 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.

- STAVRAKAKIS, M.; LOUKAS, M.; 1983: The between- and within-grape-cultivars genetic variation. *Sci. Hort.* **19**, 321—334.
- VALLEJOS, E. C.; 1983: Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Eds.): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, 469—516. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- VIALA, P.; VERMOREL, V.; 1901—1910: *Ampélographie*. 7 tomes. Masson Editeurs, Paris.
- WOLFE, W. H.; 1976: Identification of the grape varieties by isozyme banding patterns. *Amer. J. Enol. Viticult.* **27**, 68—73.
- — ; 1977: Application of isozyme banding patterns to the identification of cultivars and species of grapevines (*Vitis*). *Diss. Abstr. Intern., Ser. B, Sci. Eng.* **38**(6), 2533—2534.

Eingegangen am 7. 1. 1988

M. BENIN
Domaine de Ravanès
Thézan-lès-Béziers
F 34490 Murviel-lès-Béziers
France