

A CONTRIBUTION TO THE CHARACTERISATION BY ELECTROPHORESIS OF GRAPE PLANT VARIETIES CULTIVATED IN GALICIA (NW SPAIN).

MÉTHODE D'ÉTUDE POUR LA CARACTÉRISATION DE VARIÉTÉS DE *VITIS VINIFERA* CULTIVÉES EN GALICE (ESPAGNE)

M.P. SAA-OTERO*, N. CID ALVAREZ** and J.M. BOURSQUOT***

*Universidad de Vigo, Facultad de Ciencias de Ourense. Ed. Politécnico.
Las Lagunas. 32004 Ourense (Spain)

**Estación de Viticultura y Enología de Galicia. Leiro Ourense (Spain)

***E.N.S.A.M., Chaire de Viticulture, 34060 Montpellier cedex (France)

Abstract : Electrophoresis was employed as the method of study for the characterisation of *Vitis vinifera* varieties cultivated in Galicia (Spain). Mature dormant shoots were used for the study. The enzymatic system glucose-phosphate isomerase (GPI) was analysed using the method of PARFITT and ARULSEKAR (1989). Seventeen varieties (Albariño, Dona Blanca, Godello, Loureira, Treixadura, Torrontés, Albillo, Palomino, Verdejo Blanco, Macabeo, Jerez Fina, Asal Galego, Moscatel Galego, Galego Dourado, Galego de Montemor, Brancellao, and Caiño Bravo) were studied. Eight groups of phenotypes were obtained. Each one of which had clearly differentiated characteristics from more than one variety, except in the case of Garnacha.

Résumé : L'électrophorèse est employée comme méthode d'étude pour la caractérisation de variétés de *Vitis vinifera* cultivées en Galice (Espagne). Nous avons utilisé pour ceci des sarments en état de repos végétatif, qui selon BOURSQUOT *et al.* (1992) constituent un matériel adéquat pour obtenir des résultats très fiables dans la séparation de variétés. Le matériel a été recueilli en décembre et a été conservé en chambre froide durant quelques jours avant l'analyse. Pour la préparation de l'extrait, nous avons utilisé le liber, le cambium et le xylème. Le système enzymatique de la glucose phosphate isomérase (GPI) a été analysé par électrophorèse sur gel d'amidon suivant la méthode de PARFITT et ARULSEKAR (1989). Dix-sept variétés ont été étudiées (Albariño, Dona Blanca, Godello, Loureira, Treixadura, Torrontés, Albillo, Palomino, Verdejo Blanco, Macabeo, Jerez Fina, Asal Galego, Moscatel Galego, Galego de Montemor, Brancellao, Caiño Bravo). Nous avons étudié les variétés recueillies dans les collections d'Argès (Villeneuve-les-Maguelones, France), Vassal (Marseillan Plage, France), de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, France) et de l'ENSAM (École Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier, France).

Huit groupes phénotypiques ont été obtenus, très différenciés et caractéristiques de plus d'une variété, sauf pour le cas de Garnacha, à laquelle ne correspond qu'un unique phénotype.

L'extraction de protéines enzymatiques a été réalisée en chambre froide à 2°C, par trituration au mortier, de 2 g. de matériel végétal, pendant trente secondes, à basse température, avec 10 ml de tampon Tris-citrate de pH = 8 (ARULSEKAR *et al.*, 1986) et un gramme de PVPP (polyvinylpyrrolidone). Après centrifugation à 7000 g pendant 10 minutes, nous récupérons dans le surnageant pour l'analyse. L'appareil employé a été un générateur de courant continu STAVIP (APELEX) 1000D, à une tension initiale de 580 V pour 25 mA et 75 W. Pour le révélateur du gel, nous avons éliminé la partie superficielle de celui-ci et nous avons procédé suivant la méthode de PASTEUR *et al.* (1987).

Huit groupes phénotypiques ont été obtenus, très différenciés et caractéristiques de plus d'une variété, sauf dans le cas de la Garnacha, à laquelle correspond un seul phénotype.

À partir des résultats obtenus, nous pouvons affirmer que les isoenzymes constituent une méthode appropriée pour la caractérisation des variétés de vignes cultivées de manière traditionnelle en Galice. À travers la GPI, nous avons pu séparer exclusivement la variété Garnacha. En général, des groupes de deux variétés ou plus ont été obtenus, les résultats servent à apporter de nouvelles données à la connaissance, cependant, seulement lorsque le nombre de variétés étudiées sera plus complet et lorsque les modèles isoenzymatiques seront nombreux, nous pourrons nous permettre d'établir des conclusions universelles utiles non seulement à la caractérisation des variétés, mais aussi à l'établissement de critères différenciant celles-ci.

Key words : ampelography, taxonomy, variety of vine, analysis, enzyme, protein

Mots clés : ampélographie, taxonomie, cépage, analyse, enzyme, protéine

INTRODUCTION

The cultivation of grape plants in the NW of the Iberian Peninsula - in the area that today forms the Autonomous Community of Galicia - is so firmly established that a large number of varieties are considered to be natives in the five denominations of origin recognised by present day European legislation. The diversity of vegetable material and the abundance of synonymies, as well as the interrelation with varieties from the North of Portugal makes characterisation of the varieties necessary. Not only to classify the diversity, but also to define a basis for future studies of possible disease resistant varieties and their propagation with guarantees against viroses, etc.

In the last few years, ampelographic studies (CID ALVAREZ, 1993 ; LOUREIRO *et al.*, 1994), ampelometric studies (CID-ALVAREZ *et al.*, 1994 and 1998 ; MARTINEZ *et al.*, 1997) and biochemical studies (VIDAL and MASA, 1994 ; VIDAL JUMINO, 1996 ; CRESPIAN, 1998) have been made. In order to give continuity to our studies in the fields of ampelography and ampelometry, we have embarked on the characterisation of the isozyme of some varieties. The enzymatic system of the glucose-phosphate isomerase was studied in extracts obtained from mature dormant shoots, following the techniques recommended for O.I.V. These techniques have been used by different authors (ARUSEKAR and PARFITT, 1986 ; PARFITT and ARULSEKAR, 1989 ; ALTUBE *et al.*; 1991 ; CABELLO and ORTIZ, 1992 ; BOURSIQUOT and PARRA, 1992 ; VIDAL and MASSA, 1995).

MATERIEL AND METHOD

The varieties shown in table I were studied. They are included in the collections of Argèles (Villeneuveles-Maguelone), Vassal (Marseillan Plage) of INRA (Institut National de la Recherche Agronomique de France) and E.N.S.A.M. (Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier).

The enzymatic system of the glucose-phosphate isomerase (GPI) (E.C. 5.3.1.9) was analysed using electrophoresis in starch gel, according to the method of PARFITT and ARULSEKAR (1989), recommended by the O.I.V. (Bull. O.I.V., 1990).

Mature dormant shoots were studied, which, according to BOURSIQUOT *et al.* (1992), are the best material for obtaining very accurate results in the separation of varieties. The material was collected in December and conserved in cold storage until a few days before analysis. Liber, cambium and xylem were used in the preparation of the extract.

TABLE I

Studied cultivars of *Vitis vinifera* and place of source
OTU : Unity taxonomic, B : white vine, T : red vine.

Tableau I - Cépages de *Vitis vinifera* étudiés
et son emplacement.

OTU : Unités taxonomiques, B : vin blanc, T : vin rouge

OTU	Name varieties	Classe	Place of source
1	Albariño	B	1 (Argèles)
2	Dona Blanca	B	1
3	Godello	B	2 (Vassal)
4	Loureira	B	1
5	Treixadura	B	1
6	Torrontés	B	2
7	Albillo	B	2
8	Palomino	B	3 (ENSAM)
9	Verdejo Blanco	B	1
10	Macabeo	B	3
11	Jerez fina	B	1
12	Asal Galego	B	1
13	Moscatel Galego	B	2
14	Galego Dourado	B	1
15	Galego de Montemor	B	1
16	Brancellao	T	1
17	Caiño Bravo	T	1
18	Espadeiro	T	1
19	Mencía	T	1
20	Sousón	T	1
21	Garnacha Tintorera	v	3
22	Gran Negro	T	3
23	Pedrol	T	2
24	Tempranillo	T	1
25	Garnacha	T	3
26	Pical Polo	T	3
27	Caiño = Caiño Gordo	T	1
28	Caiño Longo	T	1

The extraction of enzymatic proteins was carried out inside a cold store at a temperature of 2°C. Two grams of plant material together with 10 ml. of buffer solution (Tris-citrate pH=8 - ARULSEKAR and PARFITT, 1986) and one gram of PVPP (polyvinyl-polypropyrolidone) was ground in a mortar for thirty seconds.

It was centrifuged at 7000 g for 10 minutes, recuperating the material for analysis from the supernatant. The apparatus employed was a continuous current generator STAVIP (APELEX) 1000D with an initial tension of 580v for 25mA and 75w. For the development of the gel, the surface fraction was eliminated and the procedure developed by PASTEUR *et al.* (1987) was followed.

RESULTS

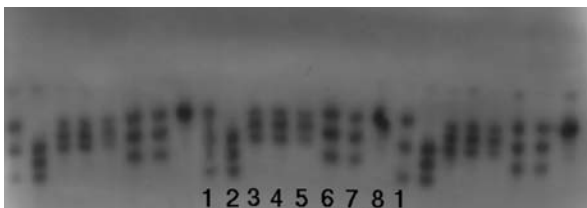
Two well-defined areas of mobility (GPI-1 and GPI-2) were observed in the zymograms. We will use the GPI-2 for the characterisation of the varieties, as, according to PARFITT et ARULSEKAR (1989), this is the most interesting from the taxonomic point of view. In all the cases, a correspondence between the observed phenotypes and those defined by the cited authors has been found (figure 1). Eight phenotype groups with clearly differentiated characteristics of more than one variety were obtained, except in the case of Garnacha, which had a unique phenotype.

Table II shows a synthesis of the results. According to these, the GPI is useful for characterising varieties ; as they group in sets of relationships, some of which contain a large number of varieties. The variety Garnacha is the only one that is clearly identified with respect to the other varieties. According to VIDAL and MASA (1994), the enzymatic systems of phosphatase acid ACP and sterase EST have been demonstrated as efficient for separating the varieties of Albariño, White Caiño, Loureira, Treixadura and Torrontés, although the later has an enzymatic pattern identical to that of Treixadura with regard to the EST and GOT

(Glutamate Oxalacetate Transaminase) systems. This study has also demonstrated that the GPI system is efficient for separating these varieties (Albariño phenotype 6, Treixadura phenotype 10, Loureira phenotype 2, and Torrontés phenotype 1). However, each one of these isoenzymes is not exclusive to these varieties. When a large number of these groups are studied, the patterns are shared by other varieties, which makes necessary the complementary use of other Ampelographic and Ampelometric characteristics.

CONCLUSIONS

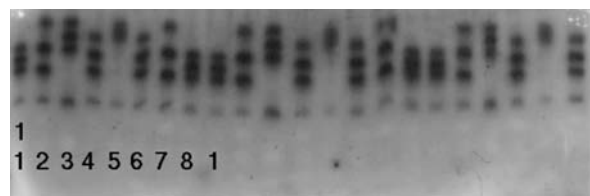
Based on these results, it can be stated that the use of isoenzymes is an appropriate method for the characterisation of the varieties of grape plants that are traditionally cultivated in Galicia. Through the use of the GPI it has only been possible to separate exclusively Garnacha. Generally groups of two or more varieties have been obtained. The results obtained contribute new data to existing knowledge in this field. However, only when the number of varieties studied is extensive and the isoenzymatic models are numerous, can useful universal conclusions be established, not only for the characterization of varieties, but also for establishing differentiating criteria.



Picture 1 - Exemple results

Photo 1 - Exemple des résultats

1 : Albariño, 2 : Albariño, 3 : Dona Blanca
4 : Galego de Montemor, 5 : Asal Galego
6 : Galego Dourado, 7 : Loureira, 8 : Treixadura



Picture 2 - Exemple results

Photo 2 - Exemple des résultats

1 : Brancellao, 2 : Sousón, 3 : Caiño Longo
4 : Moscatel Galego, 5 : Jerez Fina, 6 : Verdejo Blanco
7 : Godello, 8 : Torrontés

TABLE II

Correspondence among studied cultivars and phenotypes carried out by PARFIT and ARULSEKAR (1989).

On the abscissa : studied cultivars 1 to 28, according to table I. On the ordinates, observed phenotypes. (+) presence of the phenotype in the cultivar ; (-) : absence

Tableau II - Correspondance entre cépages étudiés et phénotypes proposés par PARFIT and ARULSEKAR (1989).

En abscisses : cépages étudiés de 1 à 28, selon tableau I. En ordonnées, F : phénotypes observés. (+) : présence du phénotype dans le cépage ; (-) : absence

Varieties of cultivation in the Galicia (Iberian peninsula)																												
F	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
1	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

REFERENCES

- ALTUBE H., CABELLO F. and J.M. ORTIZ, 1991. Caracterización de variedades y portainjertos de vid mediante isoenzimas de los sarmientos. *Vitis*, **30**, 203-212.
- ARULSEKAR S. and D.E. PARFIT, 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *Hort. Science*, **21**, 4, 928-933.
- BOURSIQUOT J. M. and P. PARRA, 1992. Application d'une méthode d'électrophorèse pour la caractérisation et la reconnaissance des porte-greffe. *Vitis*, **31**, 189-194.
- BULLETIN DE L'O.I.V., 1990. 715-716, 786.
- CABELLO F. and J.M. ORTIZ, 1992. Caracterización isoenzimática de variedades de vid de interés comercial en la D.O. de Madrid. *XX Congreso Mundial de la Viña y el Vino*, 1992. Madrid (España).
- CRESPAN M., 1998. Application de différentes méthodes de biologie moléculaire pour caractériser des porte-greffes et des raisins de table. *VII^e Congrès International sur la génétique et l'amélioration de la vigne*. Montpellier.
- CID ALVAREZ, N., 1993. Aportación al estudio ampelográfico de variedades y clones de vides Gallegas. *Tesina de Licenciatura*. Facultad de Ciencias de Ourense. Universidad de Vigo.
- CID ALVAREZ, N., BOURSIQUOT J.M., SAA-OTERO, M.P. and L. ROMANÍ MARTÍNEZ, 1994. Différenciation des cépages autochtones du Nord-Ouest de l'Espagne (Galice) et élaboration d'une clé de détermination basée sur l'ampélogométrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **28**, 1-17.
- CID ALVAREZ, N., BOURSIQUOT J.M., ROMANÍ MARTÍNEZ, L. and M.P. SAA-OTERO, 1998. Differentiation of clones of varieties of grapevines that are traditionally cultivated in NW Spain (Galicia) and elaboration of determination key for application of phillometric measures. *J. Int. Sci Vigne Vin*, **32**, 4, 183-191.
- LOUREIRO M.D. and M.C. MARTÍNEZ, 1994. Variabilidad a nivel ampelográfico en la hoja adulta de *Vitis vinifera* L. cultivar Albariño. *Actas do I Congreso Internacional de Vitivinicultura Atlántica*. A Toxa (Pontevedra), 167-172.
- MARTINEZ M.C., BOURSIQUOT J.M., GRENAN S. et R. BOIDRON, 1997. Étude ampélogométrique du cv. Grenache N (*Vitis vinifera* L.). *Can. J. Bot.*, **75**, 333-345.
- PARFITT D. E. and S. ARULSEKAR, 1989. Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **114**, 3, 486-491.
- PASTEUR N., PASTEUR G., BONHOMME F., CATALAN J. and J. BRITTON-DAVIDIAN, 1987. *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Lavoisier. Paris.
- VIDAL J.R. and A. MASA, 1994. Aproximación a la diferenciación isoenzimática de distintas morfologías existentes en la D.O. « Rías Baixas » bajo la denominación « Albariño ». *Actas do I Congreso Internacional de la Vitivinicultura Atlántica* (A Toxa-Pontevedra), 85-92.
- VIDAL JUVIÑO J.R., 1996. Caracterización bioquímica de las variedades blancas de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en la denominación de origen Rías Baixas. *Tesis Doctoral*. Santiago de Compostela.

Reçu le 5 novembre 99
 accepté pour publication le 24 janvier 2000
