

CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES VARIÉTÉS TUNISIENNES DE VIGNE

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF TUNISIAN GRAPEVINE VARIETIES

F. BEN ABDALLAH*, F. CHIBANI*, A. FNAYOU*,
A. GHORBEL*¹ et J. M. BOURSIQUOT**

*I.N.R.S.T, B.P. 95, 2050 Hammam-Lif (Tunisie)

**U.F.R de Viticulture, ENSA. M, 2 place Viala, 34060 Montpellier (France)

Résumé : 61 variétés de vigne locales ont été collectées en Tunisie en vue de leur identification biochimique. L'analyse isoenzymatique par la technique d'électrophorèse sur gel d'amidon a été employée afin de confirmer ou d'infirmer des dénominations aléatoires accordées à la majorité de ces variétés locales. Dans le but de disposer d'électrophorégrammes correctement interprétables, nous avons employé des extraits végétaux concentrés obtenus à partir de sarments vigoureux fraîchement prélevés sur des souches sélectionnées pendant l'automne. L'étude des systèmes enzymatiques GPI et PGM nous a permis de discerner 16 phénotypes. L'utilisation complémentaire des profils électrophorétiques de l'AAT et de la peroxydase nous a permis d'établir une classification des 61 variétés locales en 37 groupes comportant 26 variétés définitivement différenciées par les résultats de cette étude biochimique.

Abstract : 61 tunisian autochton grapevine varieties have been collected for biochemical identification. Isozymes analysis with starch gel electrophoresis technique was used to confirm or to cancel random denominations awarded to the majority of these local varieties. In our conditions, concentrated plant extracts were obtained from vigorous dormant canes newly cut off from selected mother plants during autumn. These allowed us to dispose of rigorously interpretable isozyme banding patterns of GPI and PGM systems and to overcome difficulties often related to the use of PGM system. The study of GPI and PGM enzyme systems allowed us to classify the autochton accessions into 16 different groups from which 5 groups containing only 2 or 3 varieties.

On the other hand, the study of AAT and peroxydase enzyme systems has shown stable and legible isozyme banding patterns allowing to discriminate between equivalent accessions such as Sakasly and Kahli (two black local vines very similar), 3 varieties of Bidh Hamem (Bidh Hamem, Bidh Hamem Rafrat and Bidh Hamem Sfax), and 2 varieties of Bezzoul Kelba Bidha (Sfax and Gabes). In addition, certain varieties having for longtime the same denominations were characterized. A case of point the 4 varieties Khalt meaning mixture (Bouchemma, Abiedh, Mdaouer and Souche 1) and the 3 varieties of Arich (Ahmar, Dressée, and Jerba) were proved to be completely different from each other. In the same way, Bezzoul Khadem has been differed from Hemri variety. The complementary use of berry colour allowed to discriminate between Saouadi, Khdhiri and Jebbi varieties and to subdivide the remaining groups into sub-groups.

The study of GPI, PGM, AAT and peroxydase isozyme banding patterns in combination with berry colour has led to establish a classification of the 61 autochton varieties into 37 groups including 26 varieties definitely differentiated through the results of this biochemical study.

Mots clés : vignes autochtones, identification, systèmes enzymatiques, classification

Key words : autochton grapevine cultivars, identification, enzyme systems, classification

INTRODUCTION

Les variétés autochtones de vigne sont en régression considérable en Tunisie. Pourtant elles sont très appréciées en raison de leur qualité d'adaptation aux conditions des régions arides. Les causes de cette dégradation sont multiples : délaissement, arrachage, monoculture, variétés commerciales... En outre, certaines

variétés (Khdhiri, Blancs...) n'ont été retrouvées qu'en un seul exemplaire, dont l'état sanitaire est très défec-tueux. Avant d'entamer un programme de sélection génétique et sanitaire, un travail préalable de prospection, d'identification et de caractérisation variétale s'impose. En effet, des appellations erronées liées à une méconnaissance taxonomique de la vigne ont été accordées à la majorité de ces variétés.

L'ambiguïté quant à la reconnaissance de ces variétés résulte de confusions relatives à des dénominations différentes et locales correspondants aux régions de plantation et parfois même aux propriétaires de vignobles. Les descriptions morphologiques classiques étant susceptibles d'être influencées par l'environnement. Pour cela, nous avons envisagé l'utilisation de marqueurs biochimiques plus stables et ce, afin d'identifier et de caractériser ces variétés autochtones. La couleur de la baie, caractère stable et évident pour la discrimination des variétés de vigne a été également prise en considération.

Dans le présent travail nous avons employé 4 systèmes enzymatiques à savoir la Glucose phosphate isomérase (GPI), la Phosphoglucose mutase (PGM), l'Aspartate Aminotransférase (AAT) et la Péroxydase qui se sont montrés performants pour l'établissement d'une classification des variétés locales.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I- MATÉRIEL VÉGÉTAL

Des sarments aotûés et vigoureux de 30 cm de long et de 1 à 1,5 cm de diamètre appartenant à 61 variétés locales (tableau I) ont été collectés à partir de prospections réalisées sur tout le territoire tunisien (figure 1). Le prélèvement des échantillons a été fait entre le 15 novembre et le 10 février. Les sarments collectés ont été conservés dans une chambre froide à 4°C. L'extraction est faite dans la même semaine.

II- PRÉPARATION DES EXTRAITS

Le matériel servant à l'extraction (mortiers, seringue, pilons, scalpel...) est maintenu au préalable pendant 12 heures au congélateur. L'opération d'extraction est réalisée à 4°C. Le tampon d'extraction utilisé est celui décrit par BOURSIQUOT et PARRA (1996). Selon le système enzymatique étudié, les extraits sont préparés selon deux méthodes :

1) Pour la GPI et PGM : 15 à 20 rondelles de bois très fines sont broyées à la main dans un mortier en présence de 500 µl de tampon d'extraction récent, 150 mg de polyvinyl-polypyrrolidone (PVP) et une pincée de sable de Fontainebleau. Les broyats sont recueillis dans des tubes plongés dans de la glace pilée. Les surnageants recueillis après une centrifugation de 20 mn à 4°C et à 10.000 rpm sont employés pour l'électrophorèse. Ils peuvent être ainsi conservés pendant 2 jours à -30°C.

2) Pour l'AAT et la peroxydase : 20 à 25 rondelles de bois dont l'épiderme a été pelé jusqu'à l'apparition

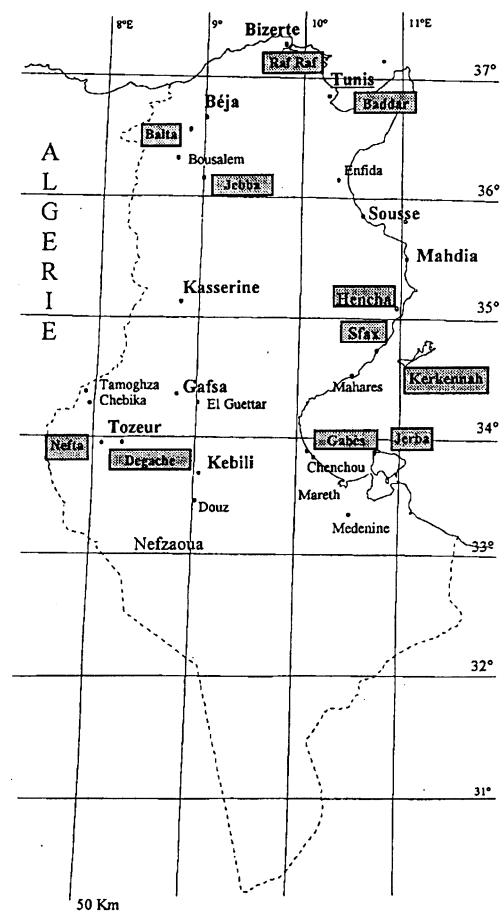


Fig. 1 - Carte de la Tunisie montrant les principales régions de prospections de la vigne (*Vitis vinifera* L.)

Fig. 1 - Tunisian map showing the main local vines (*Vitis Vinifera* L.) prospecting areas

de la couleur verte du parenchyme cortical au moyen d'une lame à rasoir sont broyées à la main dans un mortier en présence de 1,5 ml de tampon d'extraction et 150 mg de PVP. Le liquide d'extraction est obtenu par pression au moyen d'une seringue.

III- PRÉPARATION DU GEL

Pour la GPI et la PGM, le tampon gel est préparé à partir de deux solutions tampons : Lithium Borate (A) et Tris citrate (B) à raison de 1 volume de (A) et 9 volumes de (B) soit, 40 ml (A) + 360 ml (B). Le reste de la solution A sert comme tampon électrode. La solution (A) est composée pour 2l d'eau, de 3,36 g d'hydroxyde de lithium monohydraté et de 23,78 g d'acide orthoborique (pH 8,3 ajusté avec de l'hydroxyde de lithium). La solution (B) est composée, pour 1 l d'eau, de 6,05 g de Tris et 1,47 g d'acide citrique (pH 8,3 ajusté avec du Tris).

Le gel, réalisé à partir de 48 g d'amidon, 10 g de saccharose et 400 ml de tampon gel, a pour dimensions

22 x18 x1 cm. Pour l'AAT et la peroxydase, le gel est préparé selon la méthode décrite par BOURSIQUOT et PARRA (1996).

IV- MIGRATION

Les gels sont parcourus par un courant continu (Générateur Stavip "Apelex", 1000 D) avec une tension initiale de 400 V pour 75 mA et 33 W. Après environ 30 mn, on arrête momentanément l'électrophorèse et les papiers Whatman ayant servi à absorber les extraits sont retirés pour éviter l'altération de la migration. La durée de l'électrophorèse est de 4 à 5 h et la température est maintenue par refroidissement à 4 °C.

V- RÉVÉLATION

Les solutions de révélation utilisées pour les 4 systèmes enzymatiques étudiés sont celles décrites par ARULSEKAR et PARFITT (1986) et par PASTEUR *et al.* (1987).

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les prélèvements et les analyses ont été effectués sur des sarments aoûtés au cours des automnes et des hivers 1995-1996-1997. Les électrophorégrammes réalisés à partir de ces sarments ont donné le plus souvent une résolution supérieure par rapport à celle obtenue à partir des boutures herbacées ou de tissus foliaires (BOURSIQUOT et PARRA, 1992).

Après vérification de leur bonne résolution, les profils des variétés Muscat de Rafram et de Sakasli ont été utilisés comme marqueurs de référence pour contrôler l'uniformité de la migration. La stabilité des migrations pour les systèmes enzymatiques étudiés a été vérifiée et confirmée par des zymogrammes obtenus après 3 répétitions et ce, à différentes époques de l'année.

I- PROFILS ENZYMATIQUES GPI et PGM

Les profils électrophorétiques de la GPI (figure 4) montrent deux zones d'activité différentes. La première notée GPI-1 est monomorphe et présente chez toutes les variétés. Par conséquent, ce locus ne peut pas être utilisé dans l'identification des variétés. La deuxième notée GPI-2 a montré un polymorphisme important aisément résolu et reproductible (figure 2). Ce locus nous a été très utile pour l'établissement d'une discrimination préliminaire entre les variétés. Selon SUBDEN *et al.* (1987), le polymorphisme de la GPI-2 est très intéressant dans une optique taxonomique.

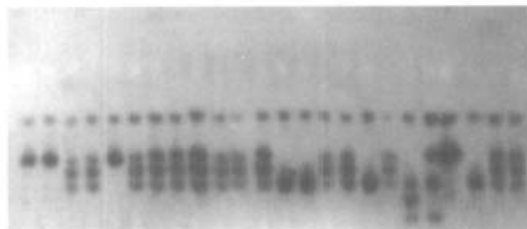


Fig. 2 - Profils enzymatiques de la GPI

Fig. 2 - GPI isozyme banding patterns



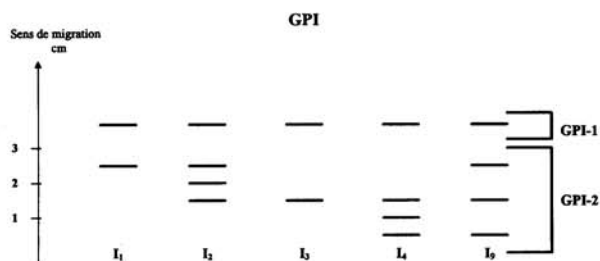
Fig. 3 - Profils enzymatiques de la PGM

Pour les deux profils GPI, PGM (de gauche à droite), on a les variétés: 7, 52, 30, 22, 28, 23, 38, 16, 4, 55, 54, 11, 9, 17, 13, 10, 36, 44, 20, 56, 34, 45, 60 et 26 (tableau I)

Fig. 3 - PGM isozyme banding patterns

from the left to the right, the varieties are: 7, 52, 30, 22, 28, 23, 38, 16, 4, 55, 54, 11, 9, 17, 13, 10, 36, 44, 20, 56, 34, 45, 60 et 26 (table I)

Les différentes configurations de la GPI-2 sont résolues en une ou 3 bandes stables avec des profils qui plaident pour une structure dimérique de l'enzyme. Selon WEEDEN *et al.* (1988), il s'agit d'une enzyme résultant de l'expression de deux allèles d'un même gène à un seul locus. Un phénotype à trois bandes reflète alors un génotype hétérozygote, alors que celui ayant une bande correspond à un génotype homozygote.



- I₁ : 7, 8, 24, 25, 28, 34, 52, 53.
- I₂ : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 48, 50, 51, 54, 55, 58, 59, 60, 61.
- I₃ : 9, 12, 17, 18, 19, 36, 43, 45, 46, 47, 49.
- I₄ : 20.
- I₅ : 56, 57.

Fig. 4 - Représentation des phénotypes pour la Gluco-Phospho-Isomérase (selon la codification O.I.V.) et répartition des variétés locales par leurs numéros (tableau I)

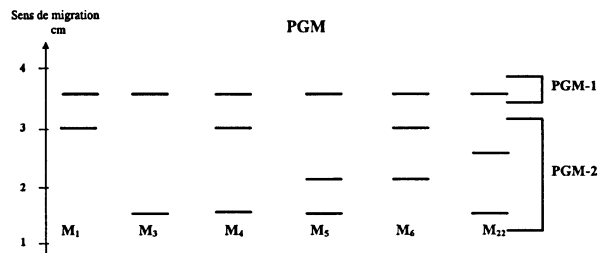
Fig. 4 - Phenotypes representation for GPI (according to O.I.V. codification) and distribution of local varieties per numbers (table I)

Ainsi, il paraît que les variétés (Asli, Blanc 1, Blanc 2, Hencha 1, Muscat de Rafraf...) formant les groupes I1 et I3 sont des homozygotes distincts.

L'analyse de ce système enzymatique nous a permis à lui seul de grouper les 61 variétés autochtones en cinq phénotypes différents (figure 4), de caractériser certaines variétés comme Beldi Sayeb et Sakasli et de répartir les autres variétés locales en trois groupes distincts d'importance inégale (respectivement 8, 11 et 39).

Pour pouvoir discriminer davantage les individus regroupés en I1, I2 et I3, l'étude d'autres systèmes enzymatiques s'est avérée indispensable. Parmi tous les systèmes que nous avons étudiés, la PGM a été retenue pour sa bonne résolution et son polymorphisme important. D'après HAUAGGE *et al.* (1987), et ARULSEKAR et PARFITT (1986), la PGM est intéressante au niveau de l'identification des cépages en raison de sa diversité allélique élevée.

Comme pour la GPI, deux zones d'activité différentes ont été également observées pour la PGM. La première notée PGM-1 demeure généralement monomorphe. Ce locus est observable quels que soient l'âge et la qualité des sarments. Contrairement à la PGM-1, l'activité de la PGM-2 (figure 5) semble être influencée par plusieurs facteurs. En effet, avec des sarments de bois aoûtés conservés plus de 4 semaines dans la chambre froide, la PGM-2 présente le plus souvent un polymorphisme difficilement discernable. Les difficultés d'interprétation de la PGM-2 dues à une mauvaise lecture de l'emplacement des bandes ont été mentionnées par BOURSQUOT et PARRA (1996). En revanche, les révélations de l'activité enzymatique de ce système s'améliorent nettement lorsque ces sarments ont été trempés dans l'eau pendant 24 heures juste avant leur analyse. Elles sont aussi d'autant plus nettes que les extraits sont concentrés et que la durée de conservation en chambre froide est réduite. Les meilleures séparations ont ainsi été obtenues avec des extraits concentrés (500 µl), réalisés préférentiellement à l'automne sur des sarments aoûtés prélevés sur des plantes vigoureuses et aussitôt analysés (figure 3). On distingue alors deux différentes configurations (M1, M3) à bande unique regroupant respectivement 12 et 20 phénotypes et 4 groupes différents à double bande (M4, M5, M6, M22) contenant respectivement 11, 3, 12 et 3 phénotypes (figure 5). En ce qui concerne le M22, il est important de préciser que c'est la première fois que ce phénotype est signalé comportant en outre des cépages au nombre de 3. Dans ces conditions, la PGM-2 présente un polymorphisme assez performant pour la discrimination des variétés.



M₁ : 3, 10, 24, 25, 21, 29, 30, 34, 41, 43, 54, 59.

M₃ : 12, 14, 15, 17, 18, 19, 22, 27, 31, 35, 40, 45, 46, 48, 49, 51, 55, 56, 57, 58.

M₄ : 1, 13, 16, 26, 36, 38, 39, 42, 47, 52, 53.

M₅ : 20, 23, 32.

M₆ : 2, 4, 5, 6, 9, 11, 28, 33, 37, 44, 50, 61

M₂₂ : 7, 8, 60.

Fig. 5 - Représentation des phénotypes pour la Phospho-Gluco-Mutase (selon la codification O.I.V.) et répartition des variétés locales par leurs numéros (tableau I)

Fig. 5- Phenotypes representation for PGM (according to O.I.V. codification) and distribution of local varieties per numbers (table I)

Ainsi, utilisé en combinaison avec la GPI-2 (tableau II), la PGM-2 nous a permis de montrer la différence ou d'envisager l'équivalence de certains génotypes ayant la même dénomination mais appartenant à des régions différentes et présentant parfois quelques variations morphologiques. PARFITT et ARULSEKAR (1989) ont reporté que des cultivars ayant les mêmes profils enzymatiques ne doivent pas forcément être considérés comme identiques, alors que des individus ayant des profils enzymatiques distincts pour un système donné sont génétiquement différents. Le Muscat d'Alexandrie et le Muscat de Rafraf, Sakasli Badar et Sakasli Jerba, Blanc 1 et Blanc 2, Asli Haddab et Asli Dar Sliman, Kahli Sfax et Kahli Kerkennah, Balta 1 et Balta 4 se sont ainsi respectivement montrés équivalents.

Selon SUBDEN *et al.* (1987), les différences morphologiques qui apparaissent parfois sur les clones d'un même cultivar reflètent le polymorphisme des gènes contrôlant la morphologie de la plante et non ceux associés au métabolisme principal. Cette remarque peut être ici appliquée aux trois origines de Arich (Arich Ahmar, Arich dressé et Arich Jerba) ainsi qu'à celles de Beldi (Beldi, Beldi-local rafraf et Beldi Rafraf).

En contrepartie, les différentes origines de Hencha (1 et 2), de Bezzoul Kelba Bidha (de Sfax et de Gabès) et de Bidh Hamem (Bidh Hamem, Bidh Hamem Rafraf, et Bidh Hamem Sfax) ont montré des profils enzymatiques différents soit au niveau de la PGM-2 soit au niveau de la GPI-2 (figures 4 et 5) ce qui montre que ces génotypes ne peuvent en aucun cas être considérés comme des clones d'une même variété. La com-

TABLEAU I
Liste des variétés locales analysées avec leur origine
Table I - List of analysed local vines and their origin

N°	Variété	Origine	N°	Variété	Origine
1	Akhel Mguergueb	Rafraf	32	Guelb Sardouk	Nefta
2	Amokrane	Mornag	33	Hemri Kerkennah	Kerkennah
3	Arbia	Mornag	34	Hench 1	La Hencha
4	Arich Ahmar	Mornag	35	Hench 2	La Hencha
5	Arich Dressé	Mornag	36	Jebbi	Djebba
6	Arich Jerba	Jerba	37	Jerbi Dguech	Dguèche
7	Asli Dar Slimane	Kerkennah	38	Kahli Kerkennah	Kerkennah
8	Asli Hadab	Kerkennah	39	Kahli Sfax	Sfax
9	Bezzoul Kelba Bidha Gabes	Gabes	40	Khalt Abiedh	Tozeur
10	Bezzoul Kelba Bidha Sfax	Sfax	41	Khalt Bouchemma	Gabes
11	Bezzoul Khadem	Rafraf	42	Khalt Mdaouer	Gabes
12	Bahbahi	Rafraf	43	Khalt Souche 1	Nefta
13	Balta 1	Balta	44	Khamri Tozeur	Tozeur
14	Balta 2	Balta	45	Khdhiri 1	Djebba
15	Balta 3	Balta	46	Khdhiri 2	Djebba
16	Balta 4	Balta	47	Khdhiri 3	Djebba
17	Beldi	Baddar	48	Mahdaoui	Kerkennah
18	Beldi local rafraf	Rafraf	49	Marsaoui	Rafraf
19	Beldi rafraf	Rafraf	50	Mdina	Gabes
20	Beldi Sayeb	Mornag	51	Meski local Tozeur	Tozeur
21	Bidh Hmem	Baddar	52	Muscat d'Alexandrie	Baddar
22	Bidh Hmem Rafraf	Rafraf	53	Muscat de Rafraf	Rafraf
23	Bidh Hmem Sfax	Sfax	54	Razaki Rafraf	Rafraf
24	Blanc 1	Djebba	55	Razegui	Baddar
25	Blanc 2	Djebba	56	Sakasli	Baddar
26	Blanc 3	Djebba	57	Sakasli Jerba	Jerba
27	Chaâraoui	Rafraf	58	Saouadi	Nefta
28	Chaouch Jerba	Jerba	59	Sfaxi 2'	Nefta
29	Dattier de Beyrouth	Baddar	60	Tounsi Jerba	Jerba
30	El Biodh	Jerba	61	Turkey	Baddar
31	Farrani	Rafraf			

binasion de ces deux systèmes nous a en définitive permis de les classer en 16 groupes, de différencier 6 variétés et de rassembler 10 groupes composés respectivement de 2, 3, 8, 7, 7, 11, 2, 10, 2, 2 variétés locales (tableau II).

Dans une optique d'identification plus poussée, la couleur de la baie considérée comme un caractère discriminant fiable et évident a été prise en considération pour pouvoir séparer certaines variétés encore groupées. Se basant sur ce caractère, les groupes D, F, H et N assez chargés en variétés équivalentes se sont subdivisés chacun en deux sous groupes respectivement de (4,3) ; (10, 1) et (7,3) et (1,1). Ce caractère nous a ainsi permis d'individualiser les variétés Saouadi,

Khdhiri 3 et Jebbi. Au total, en tenant compte de la combinaison de ces 3 caractères, les variétés autochtones ont été classées en 20 groupes différents parmi lesquels 9 variétés ont été individualisées et caractérisées, sachant que le Muscat de Rafraf et le Muscat d'Alexandrie sont génétiquement identiques (BOUBALS, 1995) (tableau II).

II- PROFILS ENZYMATIQUES PÉROXYDASE ET AAT

Afin de discriminer de façon plus approfondie les variétés au sein des groupes restants, nous avons été amenés à employer deux autres systèmes enzymatiques : la peroxydase et l'AAT. Ces deux systèmes ont

TABLEAU II
Classification des variétés locales, selon GPI, PGM et couleur de la baie.

Table II - Classification of local vines varieties according to GPI, PGM and berry colour

Variétés locales	Couleur de la baie	Groupes
Asli Hadab, Asli Dar Sliman	blanche	A
Blanc 1, Blanc 2, Hancha 1	blanche	B
El Biodh, Bidh Hamem, Bezzoul Kelba Bidha de Sfax, Razaki Rafraf, Dattier de Beyrouth, Khalt Bouchemma, Arbia, Sfaxi 2'	blanche	C
Balta1, Balta4, Khalt Mdaouer, Blanc3	blanche	D ₁
Kahli Kerkennah, Kahli Sfax, Akhel Mguergueb	noire	D ₂
Khdhiri1, khdhiri2, Beldi, Beldi-local Rafraf, Beldi Rafraf, Bahbahi, Marsaoui	blanche	E
Hencha2, Bidh Hamem Rafraf, Balta2, Balta3, Razegui, Farrani, Khalt Abiedh, Meski local tozeur, Châaraoui, Mehdaoui	blanche	F ₁
Saouadi	noire	F ₂
Bidh Hamem Sfax, Guelb Sardouk	blanche	G
Amokrane, Bezzoul Khadem, Arich Ahmar, Arich Dressée, Turkey, Khamri Tozeur, Hemri Kerkennah	rougeâtre	H ₁
Jerbi Dguèche, Mdina, Arich Jerba	blanche	H ₂
Chaouch Jerba	blanche	I
Muscat de Rafraf, Muscat d'Alexandrie	blanche	J
Tounsi Jerba	blanche	K
Khalt Souche 1	blanche	L
Bezzoul Kelba Bidha de Gabes	blanche	M
Kdhiri 3	noire	N ₁
Jebbi	blanche	N ₂
Beldi Sayeb	blanche	O
Sakasli, Sakasli Jerba	rougeâtre	P

montré en effet des zymogrammes stables et facilement lisibles permettant de nous prononcer plus clairement sur les variétés analysées non encore identifiées (figures 6, 7).

Dans notre cas, la peroxydase a présenté deux zones d'activité différentes : La première, proche de l'anode et possédant une grande mobilité s'est avérée monomorphe, la deuxième située au-dessous a montré en

revanche un polymorphisme plus important permettant de déceler 5 phénotypes distincts P1-P5 (figure 8) manifestant des profils bien visualisables et qui nous ont été utiles dans la discrimination des variétés non identifiées par les systèmes précédents. Nous avons pu ainsi individualiser les variétés Hencha 1, Khalt Bouchemma, (Blanc 3, Balta1), Akhel Mguergueb, Marsaoui, (Bidh Hamem Sfax, Guelb Sardouk), Bezzoul Khadem et Jerbi Deguèche. A une exception

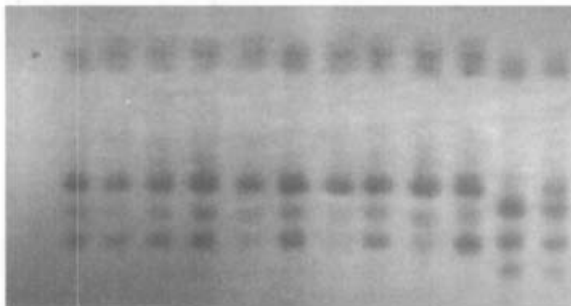


Fig. 6 - Profils enzymatiques de la peroxydase
 de gauche à droite, on a les variétés: 35, 22, 14, 15, 55, 31, 40, 51, 27, 48, 23 et 32 (tableau I)

Fig. 6 - Peroxidase isozyme banding patterns
 from the left to the right, the varieties are: 35, 22, 14, 15, 55, 31, 40, 51, 27, 48, 23 et 32 (table I)

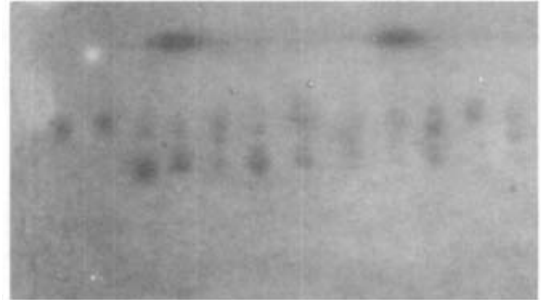


Fig. 7 - Profils enzymatiques de l'AAT
 de gauche à droite, on a les variétés: 24, 25, 34, 30, 21, 10, 54, 41, 3, 59, 13 et 16 (tableau I)

Fig. 7 - AAT isozyme banding patterns
 from the left to the right, the varieties are: 24, 25, 34, 30, 21, 10, 54, 41, 3, 59, 13 et 16 (table I)

TABLEAU III
Résultats de la discrimination par la peroxydase et l'AAT au sein
des groupes de variétés locales non individualisées par la GPI, la PGM et la couleur des baies
Table III - Results of discrimination by peroxydase and AAT within groups
of local varieties non identified by GPI, PGM and berries colour

Groupe selon (GPI, PGM)	Peroxydase (P)	AAT (A)	Variétés locales	Groupes
B	5	1	Blanc 1, Blanc 2	B ₁
	4	3	Hencha 1	B ₂
	5	3	Bidh Hamem	C ₁
C	5	4	Arbia	C ₂
	1	3	El Biodh, Bezzoul Kelba Bidha de Sfax, Razaki Rafraf, Dattier de Beyrouth	C ₃
	3	4	Khalt Bouchemma	C ₄
	5	4	Blanc 3	D ₁₁
D₁	3	1	Balta 1	D ₁₂
	4	4	Balta 4	D ₁₃
	4	3	Khalt Mdaouer	D ₁₄
D₂	1	4	Akhel Mguergueb	D ₂₁
	4	3	Kahli Kerkennah, Kahli Sfax	D ₂₂
E	5	1	Khdhiri 1, Khdhiri 2, Bahbahi	E ₁
	5	4	Beldi, Beldi Rafraf, Beldi local Rafraf	E ₂
	1	3	Marsaoui	E ₃
F₁	5	1	Châaraoui, Bidh Hamem Rafraf	F ₁₁
	5	4	Hencha 2, Balta 2, Balta 3, Razegui, Farrani, Khalt Abiedh, Meski local Tozeur, Mahdaoui	F ₁₂
	3	4	Bidh Hamem Sfax	G ₁
G	2	1	Guelb Sardouk	G ₂
	1	5	Amokrane	H ₁₁
	1	4	Khamri Tozeur	H ₁₂
	3	1	Arich Dressé, Hemri Kerkennah, Turkey	H ₁₃
	3	2	Arich Ahmar	H ₁₄
H₁	4	5	Bezzoul Khadem	H ₁₅
	1	4	Jerbi Dguèche	H ₂₁
	1	4	Mdina, Arich Jerba	H ₂₂

près, ce système nous a permis de subdiviser chaque groupe en au moins 2 sous-groupes. Malgré les problèmes liés au masquage de l'activité peroxydasique par l'oxydation des composés phénoliques (CABONI *et al.*, 1994, HMOUNI, 1995), les profils électrophorétiques obtenus n'ont montré aucune altération (figure 6). Ceci est probablement lié à la qualité du matériel végétal (fraîchement prélevé) et à la période de prélèvement des sarments. En effet, BACHMANN (1994) a déjà signalé que les tissus du phloème des sarments aoûtés de vigne contenaient moins de substances phénoliques que les tissus foliaires.

Les zymogrammes que nous avons obtenus ont montré que l'AAT était également polymorphe.

Il semble que les zones cambiales des sarments aoûtés favorisent, pour ce système, la production de profils électrophorétiques bien résolus. 5 phénotypes différents A1 à A5 (figure 9) ont été détectés de façon répétitive dans la zone de moindre mobilité. Selon BOURSIQUOT et PARRA (1996), les phénotypes qui apparaissent dans cette zone pourraient résulter de l'interaction entre les isozymes AAT-3 et AAT-4 mentionnés par WEEDEN *et al.* (1988). Ce système a permis à lui seul d'identifier 10 variétés dont 7 avaient été également identifiées par la peroxydase. Il s'agit de Hencha 1, Balta 1, Akhel Mguergueb, Marsaoui, Bidh Hamem Sfax et Guelb Sardouk, Jerbi Deguèche et 3 variétés supplémentaires qui sont Khalt Mdaouer, Arich Ahmar et Khamri Tozeur. Les regroupements

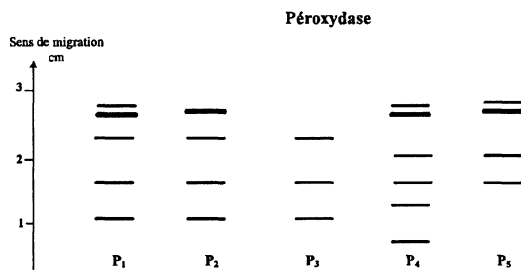


Fig. 8 - Représentation des phénotypes pour la peroxydase

Fig. 8- Phenotypes representation for peroxydase

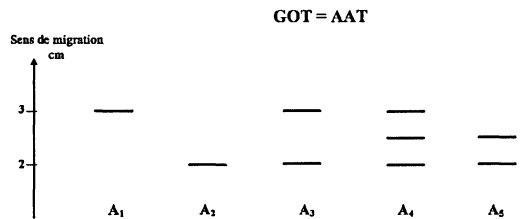


Fig. 9 - Représentation des phénotypes pour l'Aspartate Amino Transférase

Fig. 9 - Phenotypes representation for Aspartate Amino Transferase

qui subsistent ont été subdivisés chacun en au moins 2 sous-groupes de phénotypes facilitant ainsi leur discrimination.

Employés en combinaison, l'AAT et la peroxydase ont bien prouvé leur utilité pour l'identification taxonomique. Ainsi, nous avons obtenu un complément de 17 variétés différenciées, le reste des variétés locales étant réparti en groupes de 2, 2, 3, 2, 3, 3, 2, 8, 3 et 2 phénotypes (tableau III).

Ces deux systèmes ont permis en outre de lever l'ambiguïté liée à la dénomination de certaines variétés locales telles que Balta 1, et Balta 4 et les 3 origines de Khalt (Mdaouer, Bouchemma et Abiedh) ont été distinguées, chacune d'elle formant une variété à part (tableau III). De même, la variété Bezzoul Khadem s'est distinguée de la variété Hemri Kerkennah. En revanche d'autres variétés sont encore équivalentes et nécessitent des analyses complémentaires pour pouvoir les discriminer, tels que le cas des 3 Beldi, des 2 Khdhiri et des 2 Blancs, à moins qu'ils ne s'agissent de différents clones de ces variétés. Quant aux variétés Razaki et Dattier de Beyrouth, nous ne les avons pas considérées dans cette discrimination puisqu'elles ont toujours représenté des synonymes classiques.

Le pouvoir discriminant manifesté par l'AAT et la peroxydase semble être lié à la diminution de la concentration du tampon d'extraction ramenée à 1,5 ml, à la quantité optimale de PVP fixée à 150 mg, à l'extrac-

tion en chambre froide et surtout à la période de prélèvement et à la qualité du matériel végétal utilisé (sarments aoûtés vigoureux d'une plante en bon état physiologique prélevés à l'automne-hiver et aussitôt analysés). Dans ces conditions, nous pensons que l'AAT et la peroxydase associées à la GPI et à la PGM peuvent être utilisés comme systèmes de base dans l'identification et la caractérisation des variétés. En concordance avec nos résultats, BACHMANN (1994) a reporté que les isozymes de la peroxydase peuvent être utilisés comme caractère biochimique pour la discrimination entre les variétés de vigne. Pour l'AAT, les sarments aoûtés représentent un matériel idéal aboutissant à des profils électrophorétiques bien lisibles et distincts (WALKER et BOURSIQUOT, 1992).

En définitive, sur les 61 variétés autochtone analysées, la révélation de 4 systèmes enzymatiques (GPI, PGM, AAT et peroxydase) et la couleur de la baie nous ont permis de différencier 26 variétés (tableaux II et III) et de former 7 groupes composés respectivement de 3, 3, 3, 4, 6, 6 et 8. Il paraît toutefois nécessaire dans une optique de taxonomie, d'envisager l'utilisation complémentaire des marqueurs moléculaires (R.A.P.D, microsatellites...) qui seront plus performants pour parvenir à discriminer les variétés locales demeurées équivalentes avec les 4 systèmes enzymatiques étudiés.

CONCLUSION

A la lumière de ces résultats, nous pouvons dégager l'utilité de l'étude des méthodes isoenzymatiques dans une optique de caractérisation et de classification des variétés. Dans nos conditions d'expérimentation, des extraits concentrés et aussitôt analysés, préparés à partir de sarments de bois vigoureux prélevés sur des souches pendant l'automne-hiver nous ont permis de vaincre les difficultés souvent liées à l'utilisation de la PGM. Ainsi, les profils électrophorétiques des deux systèmes GPI et PGM ont été aisément révélés et facilement interprétés. L'adjonction d'une centrifugation à 10000 rpm pendant 20 mn, nous fait gagner énormément sur la netteté de séparation des bandes.

L'étude du polymorphisme de ces deux systèmes enzymatiques nous a permis d'identifier 6 variétés et de répartir de façon fiable les 61 variétés autochtones en 16 groupes distincts dont cinq sont formés uniquement de 2 ou 3 variétés. La distinction entre les variétés équivalentes a été en partie réalisée grâce à d'autres systèmes enzymatiques en l'occurrence l'AAT et la peroxydase. C'est le cas : des 3 variétés (Bidh Hamem, Bidh Hamem Rafraf et Bidh Hamem Sfax), des deux variétés Bezzoul Kelba Bidha (de Sfax et de Gabès) et des deux variétés Sakasli et Kahli (cépages noirs visuellement très proches).

L'utilisation complémentaire du caractère couleur de la baie a permis de distinguer 3 variétés (Saouadi, Khdhiri 3 et Jebbi) et de subdiviser davantage les groupes importants de variétés locales équivalentes, en sous-groupes. Ce caractère pris en considération avec les résultats du polymorphisme enzymatique (GPI, PGM) a permis d'établir une première classification. Cette dernière a été finalisée par l'utilisation de l'AAT et de la peroxydase. Ces systèmes ont révélé un polymorphisme pouvant être utilisé dans un objectif d'identification taxonomique, leur pouvoir discriminant étant si important que les variétés formant certains groupes ont été complètement différenciées.

En effet, ces deux systèmes ont permis de caractériser certaines variétés, objets de litiges. Les 4 variétés Khalt, qui signifie mélange, se sont avérées complètement différentes (Bouchemma, Abiedh, Mdaouer et Souche1). De même, Bezzoul Khadem s'est distinguée de la variété Hemri. La même remarque est valable pour les 3 variétés Arich (Arich Ahmar, Arich Dressée et Arich Jerba).

En définitive, 37 groupes ont été différenciés et 26 variétés ont été définitivement identifiées (tableaux II et III), bien que certaines caractérisations ampélographiques classiques laissent croire le contraire (ASKRI, 1997). Toutefois cette identification, demeure encore incomplète au sein des variétés locales formant les groupes A, B1, C3, D22, E1, E2, F11, F12, H13, H2 et P (tableaux II et III) c'est pourquoi, l'utilisation des marqueurs moléculaires tels que RAPD, microsatellites (BOURSIQUOT et THIS, 1996) devient une nécessité incontournable pour discriminer de façon plus approfondie et indubitable ces variétés autochtones et établir une appellation rigoureuse des variétés tunisiennes. Actuellement, une vingtaine de ces variétés recensées sont à l'essai dans le Sahara tunisien afin d'évaluer leur potentialités d'adaptation, leur précocité ainsi que leur production dans ces conditions arides particulières.

Remerciements : Les auteurs sont très reconnaissants à Messieurs Patrice THIS et Pierre PARRA de l'INRA de Montpellier pour leur précieuse collaboration scientifique et technique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARULSEKAR S. et PARFITT D., 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *Hort Sci.*, **21**, 4, 928-933.
- ASKRI F., 1997. Etude Nationale sur la diversité biologique. Chapitre Viticulture. *Rapport GEF/MEAT*, Ministère de l'Environnement, Tunis, 36p.
- BACHMANN O., 1994. Peroxydase isoenzyme patterns in Vitaceae. *Vitis*, **33**, 151-153.
- BOUBALS D., 1995. La viticulture tunisienne actuelle. *Prog. Agric. Vitic.*, **21**, 462-469.
- BOURSIQUOT J.M. et PARRA P., 1992. Application d'une méthode d'électrophorèse pour la caractérisation et la reconnaissance des porte-greffes. *Vitis*, **31**, 189-194.
- BOURSIQUOT J.M. et PARRA P., 1996. Contribution à l'utilisation des isozymes pour l'identification des porte-greffe et des cépages. *Riv. Vitic. Enol.*, **1**, 41-49.
- BOURSIQUOT J.M. et THIS P., 1996. Les nouvelles techniques utilisées en ampélographie : informatique et marquage. *J. Int. Sci. Vigne Vin. In : La Viticulture à l'aube du IIIe millénaire (n° hors série)*. Ed. Vigne et Vin Publications Internationales, 13-23.
- CABONI E., SPERANZA S. et DAMIANO C., 1994. Effect of phenols on Peroxydase activity and *in vitro* rooting of "M9 Jork". *Adv. Hort. Sci.*, **8**, 49-51.
- HMOUNI D., 1995. Identification ampélographique et assainissement de variétés autochtones de *Vitis vinifera* L. *DEA*, Fac. Sci., Tunis, 75pp.
- HAUAGGE R., KESTER D.E. et ASAY R.A., 1987. Isozyme variation among California almond cultivars : 1. Inheritance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **112**, 687-693
- PARFITT D.E. et 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. et BRITTON-DAVIDAN J., 1987. *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Ed. Lavoisier, Paris. 217 pp.
- SUBDEN R.E., KRIZUS A., LOUGHEED S.C. et CAREY K., 1987. Isozyme characterization of *Vitis* species and some cultivars. *Am. J. Enol. Viticult.*, **38**, 176-181.
- WALKER M. A. et BOURSIQUOT J.M., 1992. Ampelographic and isozym data correcting the misnaming of the grape rootstock SO4 at the University of California, Davis. *Am. J. Enol. Viticult.*, 261-265.
- WEEDEN N.F., REISH B.I. et MARTENS M.H., 1988. Genetic analysis of isozyme polymorphism in Grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **113**, 765-769.

Reçu le 8 septembre 1997 ; révisé le 13 janvier 1998 ;
Accepté pour publication le 15 janvier 1998