

EVALUATION PRÉCOCE *IN VITRO* DE LA RICHESSE EN ANTHOCYANES DES BAIES DE VIGNE. APPLICATION A LA SELECTION DE SOMACLONES DE *VITIS VINIFERA* cv. DURAS.

J.P. ROUSTAN et J. FALLOT

Institut National Polytechnique, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, EA DRED 832, 145 avenue de Muret, 31076 Toulouse cedex (France)

INTRODUCTION

La typicité des vins rouges de l'Appellation d'Origine Contrôlée Gaillac tient essentiellement à la présence de deux variétés, le Duras et le Fer Servadou. A partir de 1994, l'encépagement devra comporter 40 p. cent de Duras et 20 p. cent de Fer Servadou.

Le Duras s'avère donc le cépage autochtone principal de ce vignoble. Ses raisins présentent des caractéristiques aromatiques spécifiques mais possèdent une faible teneur en anthocyanes qui conduit à des vins insuffisamment colorés. Les clones de Duras actuellement cultivés sont assez semblables du fait de l'extension limitée de cette variété et de la faible variabilité intravariétale vis-à-vis de la qualité recherchée. Une voie possible, pour amplifier la variabilité au sein de cette variété, consiste à exploiter la variation somaclonale, liée au processus de régénération par embryogenèse somatique.

Cependant, la sélection précoce des somaclones possédant le caractère recherché est un problème important. Chez la vigne, la teneur en anthocyanes est contrôlée génétiquement mais elle est également influencée par l'environnement. PIRIE et MULLINS (1976) ont montré que les disques de feuille peuvent, dans des conditions contrôlées, accumuler des anthocyanes. Dans ces conditions, le pouvoir de synthèse des tissus foliaires est en corrélation avec la richesse en anthocyanes des baies (CARBONNEAU, 1980).

L'objectif de cette note est de développer un test physiologique *in vitro*, fondé sur la capacité de synthèse d'anthocyanes des tissus foliaires de vitroplants cultivés *in vitro*. La stratégie repose sur l'existence d'une variabilité marquée de la richesse des baies en anthocyanes chez diverses variétés de Gamay. Il est admis que le Gamay Fréaux possède un grand pouvoir colorant (teinturier) et que le Gamay de Bouze doit être considéré comme peu teinturier. Ces deux variétés dérivent par mutations du Gamay noir à jus blanc (GALET, 1958). On vérifiera tout d'abord, chez ces trois variétés, l'existence d'une corrélation positive entre la riches-

se en anthocyanes des feuilles de vitroplants, des feuilles de ceps au vignoble et des baies. Ensuite, le test mis au point sera utilisé en vue de sélectionner précocement des somaclones de Duras aptes à produire des baies riches en anthocyanes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal, constitué de Duras clone 555 et des trois variétés de Gamay : Gamay noir à jus blanc, Gamay de Bouze et Gamay Fréaux, a été fourni par la SICAREX S.O. (Gaillac).

Les vitroplants de ces divers cépages sont multipliés *in vitro* par microbouturage sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) dont la concentration des macroéléments est divisée par 2, additionné de saccharose (20 g/l) et d'agar (7 g/l) (milieu MS/2). Le pH est ajusté à 5,7 avant autoclavage à 120°C, pendant 20 mn. Les cultures sont maintenues à 25°C et sous un éclairage de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tubes Osram L36W/36 Natura), dont la photopériode est de 16 h.

L'embryogenèse somatique a été déclenchée à partir d'anthers (0,3-0,5 mm de long), prélevées dans des inflorescences de ceps de Duras clone 555, selon le protocole décrit par MAURO *et al.* (1986). Les embryons somatiques apparaissent sur des cals embryogènes, après 4 mois de culture. Ils sont ensuite transférés sur le milieu MS/2 pour favoriser leur développement et leur conversion en plantule. Les somaclones obtenus sont multipliés *in vitro* et leur capacité de produire des anthocyanes a été étudiée.

La méthode de PIRIE et MULLINS (1976) a été utilisée pour induire l'accumulation d'anthocyanes dans les disques foliaires. Les feuilles récoltées au vignoble, au cours du mois de juin, adultes et en bon état morphologique, sont stérilisées dans une solution d'hypochlorite de calcium (1 p. cent), renfermant 0,1 p. cent de Tween 20, pendant 15 mn, puis rincées 3 fois dans de l'eau distillée stérile. Les feuilles de vitroplants sont prélevées sur des plantules âgées de 6 semaines.

Dix disques foliaires (10 mm de diamètre) sont incubés dans une solution de saccharose (100 g/l, pH 5,7) pendant 15 jours, à 25°C. Les anthocyanes totales sont extraites et dosées selon la méthode de PIRIE et MULLINS (1976). Les baies récoltées à maturité ont subi le même protocole d'extraction et de dosage des anthocyanes. Les résultats sont exprimés en unité de Densité Optique à 530 nm, représentant la quantité d'anthocyanes de 0,1 g de disques foliaires ou de baies, dans 50 ml de solvant. Les résultats représentent la moyenne statistique d'au moins trois répétitions.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les quantités d'anthocyanes accumulées dans des disques foliaires de vitroplants et de ceps, incubés en présence de saccharose, ont été comparées à celles des baies des trois clones de Gamay, connus pour leur plus ou moins grande richesse en anthocyanes.

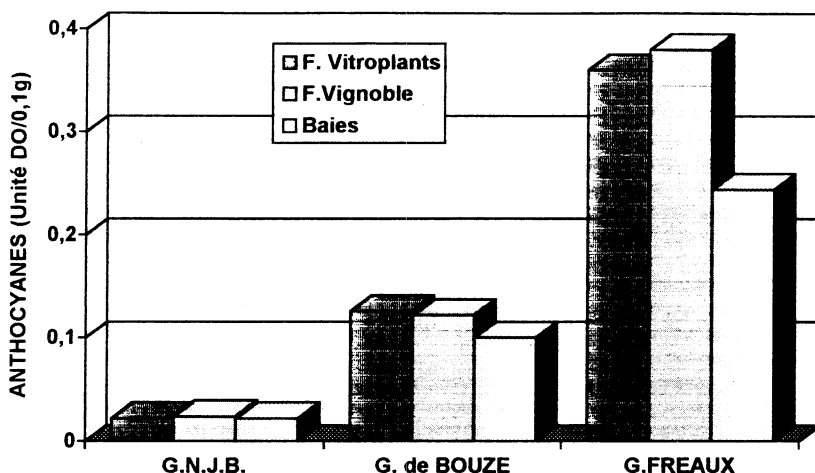


Fig. 1 — Quantité d'anthocyanes accumulées dans des disques foliaires de vitroplants et de ceps *in situ* après incubation et présentes dans les baies de Gamay noir à jus blanc (G.N.J.B.), de Gamay de Bouze et de Gamay Fréaux. Les résultats sont présentés en unité de densité optique pour 0,1 g de tissu.

Dans nos conditions expérimentales, les disques foliaires de vitroplants de Gamay, incubés en présence de saccharose, sont le siège d'une accumulation d'anthocyanes (figure 1). Cette dernière est identique à celle observée dans les disques foliaires provenant des ceps cultivés au vignoble.

La quantité d'anthocyanes produites par les disques foliaires varie en fonction de la variété. En effet, les feuilles de Gamay noir à jus blanc accumulent peu d'anthocyanes, tandis que celles de Gamay de Bouze en synthétisent de plus grandes quantités. La plus forte accumulation est observée dans les disques foliaires de Gamay Fréaux. Cette stimulation est en étroite relation avec la coloration naturelle des baies de ces trois variétés (figure 1).

Ces observations montrent clairement l'existence d'une corrélation entre l'accumulation d'anthocyanes dans les feuilles de vitroplants et l'enrichissement naturel en pigments dans les baies de ces trois variétés de Gamay.

Il serait intéressant de comparer la nature des anthocyanes élaborées dans les disques de feuille *in vitro* à celle des baies récoltées au vignoble, caractérisées par une prédominance du monoglucoside de malvidol, allant jusqu'à 70 p. cent du contenu anthocyanique selon les travaux de ROGGERO et *al.* (1988) et de DARNÉ et GLORIES (1988).

Ce test a été utilisé pour détecter la capacité des somaclones de Duras, obtenus par embryogenèse somatique à partir d'anthers, de synthétiser des anthocyanes. Des disques foliaires des cinq somaclones actuellement disponibles et largement multipliés, notés D1, D2, D3, D4 et D5, et de vitroplants du clone 555, ont été traités. Les résultats présentés dans le tableau I montrent que, dans deux expériences indépendantes, le clone D4 présente une

aptitude significativement plus grande que celle du clone 555 et des autres somaclones pour la production d'anthocyanes. Le somaclone D4 a été acclimaté au laboratoire, puis "greffé en vert" à l'ENTAV; il sera installé dans le vignoble de Gaillac pour étudier ses caractéristiques ampélographiques et ses aptitudes technologiques.

TABLEAU I

Quantité d'anthocyanes (unité DO/0,1 g de tissus foliaires) accumulées dans les feuilles de vitroplants de Duras clone 555 et de 5 somaclones

Génotypes	Clone 555	Somaclones				
		D1	D2	D3	D4	D5
Expérience 1	0,27	0,25	0,32	0,34	0,74	0,25
Expérience 2	0,39	0,36	0,45	0,51	0,70	0,34

CONCLUSION

Cette étude a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre l'aptitude des disques foliaires de vitroplants à synthétiser des anthocyanes sur un milieu artificiel et la couleur naturelle des baies chez trois variétés de Gamay choisies pour leur pouvoir colorant varié. C'est la première fois que cette relation est mise en évidence sur des tissus foliaires de vitroplants de vigne. Ceci suggère que la culture *in vitro* ne modifie pas le classement fondé sur l'intensité de la pigmentation des baies.

Par extrapolation, le test physiologique *in vitro* mis au point devrait permettre d'évaluer précocement la capacité de somaclones de vigne de produire des baies riches en anthocyanes. L'emploi d'un tel test a révélé qu'un somaclone de Duras présente une meilleure aptitude à synthétiser des anthocyanes que les autres somaclones et le clone 555. Il est clair que ces résultats doivent être validés par une étude au vignoble.

Remerciement :

Cette étude a été soutenue financièrement par l'ITV-ONIVINS. Les auteurs adressent leurs vifs remerciements à M. D. GOULARD, ITV-SICAREX S.O.

Note reçue le 24 mai 1993

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CARBONNEAU A., 1980. Early physiological tests of selection : a key for breeding programs. *Proceedings of the third international symposium on grape breeding*, Davis, 15-18 juin 1980, 147-157.

- DARNE G. et GLORIES Y., 1988. Les anthocyanes des feuilles de différentes variétés de *Vitis vinifera* L. entre la véraison des raisins et la chute des feuilles. *Vitis*, **27**, 71-78.
- GALET P., 1958. *Cépages et vignobles de France. Les cépages de cuve*. Ed. P. Galet, Montpellier.
- MAURO M.C., NEF C. et FALLOT J., 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Reports*, **5**, 377-380.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- PIRIE A. et MULLINS M.G., 1976. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid. *Plant Physiol.*, **58**, 468-472.
- ROGGERO J.P., LARICE J.L., ROCHEVILLE-DIVORNE C., ARCHIER P. et COEN S., 1988. Composition anthocyanique des cépages. I. Essai de classification par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante. *Rev. Fr. d'Œnol.*, **112**, 41-48.