Connaissance Vigne Vin, 1986, **20**, N° 1, 1-16.

# ETUDE DE LA STRUCTURE ISOENZYMATIQUE DE QUELQUES ENZYMES DE VARIETES DE *VITIS VINIFERA* ET DE PORTE-GREFFES APPLICATION A LA DETERMINATION BIOCHIMIQUE DE L'AFFINITE GREFFON-VARIETE

A. MASA

Misión Biológica de Galicia (CSIC)
Apartado 28, 36080 PONTEVEDRA, (Espagne)

## INTRODUCTION

Au cours d'un précédent travail (MASA, 1985 a) on a décrit une méthode d'étude de l'affinité entre greffons et 4 variétés de *Vitis vinifera,* basée sur la comparaison des protéines totales des deux composants de l'association végétale, et dont les résultats confirment d'autres conclusions obtenues précédemment (HIDALGO, 1981 et 1983). Selon la méthode de SAFONOV et VEIDENBERG (1969) comparant les profils électrophorétiques des protéines de la variété et du greffon, on établit des coeffficients d'affinité permettant de définir soit une compatibilité, soit une incompatibilité. Etant donné que les différences génétiques variétales peuvent également se refléter dans la composition enzymatique du matériel végétal, on a cherché à développer cette étude de l'affinité entre variété et porte-greffe en s'intéressant à quelques enzymes et, à l'intérieur de celles-ci, aux différences de structure isoenzymatique.

Dans de précédents travaux, celles-ci ont été utilisées soit à des fins taxonomiques (SHANNON et *al*, 1973 ; WOLFE, 1976 ; BASSIRI et ADAMS, 1978), soit biochimiques (PALLAVICINE, 1971), soit d'amélioration génétique (ADAMS, 1983, LOUKAS et al, 1983, ORTON, 1983), soit enfin dans un but d'appréciation de l'état sanitaire de la plante (GASPAR et al, 1982 ; BURDON et MARSHALL, 1983). Ces divers travaux, cependant, ne s'intéressent pas tous aux mêmes enzymes et les mettent en valeur de façons très diverses selon le but poursuivi. Pour notre part, on a choisi d'étudier les structures isoenzymatiques des enzymes suivantes : phosphatase alcaline, phosphatase acide, peroxydase, estérase. Celles-ci, dans la majorité des travaux dont elles ont fait l'objet, sont en effet celles qui donnent les meilleurs résultats en tant que marqueurs biochimiques ; en outre, leur prise en compte s'est révélée intéressante au cours d'études anatomiques et histologiques entreprises dans le cadre de l'affinité greffon-variété d'un certain nombre de végétaux (COPES, 1978 ;

MOORE et WALKER, 1981 ; QUESSADA et MACHEIX, 1984). C'est pourquoi, dans ce travail, on étudie la possibilité d'utiliser la composition isoenzymatique des enzymes étudiées pour déterminer l'existence ou non d'une affinité dans l'association de quelques variétés de *Vitis vinifera* et de porte-greffe. Cette étude s'inscrivant comme une suite à celle de l'affinité protéique (MASA, 1985 a), les résultats sont donc comparés à ceux obtenus avec cette dernière méthode.

## MATERIELS ET METHODES

Les essais ont été conduits sur des extraits de sarments provenant de cinq variétés de *Vitis vinifera* (Airén, Bobal, Grenache, Tempranillo, Maccabeo) ainsi que de six porte-greffes (420-A, 41-B, 99-R, 110-R, 161-49 C, 196-17 CL) récoltés au domaine d'El Encin (Alcada de Henares, Espagne) appartenant à l'Institut National de Recherches Agronomiques. Ces sarments proviennent des mêmes plants-mères que ceux utilisés par HIDALGO (1981 et 1983) dans ses études sur l'affinité culturale ainsi que par MASA (1985 a et b) dans ses essais d'affinité biochimique entre variétés de *Vinifera* et porte-greffes. Les techniques de préparation des extraits ont été décrites par ailleurs (MASA, 1985 a). Toutes les manipulations sont effectuées à basse température, entre 0 et 4 °C. Les protéines totales sont dosées par la méthode de MASA (1985 b). La séparation des isoensymes des différentes enzymes étudiées est effectuée par électrophorèse sur disque de gel à 7,5 p. 100 d'acrylamide selon la méthode de DAVIS (1964) modifiée par GABRIEL (1971). La révélation des activités phosphatase alcaline, phosphatase acide, peroxydase est faite par la technique de VEIDENBERG et SAFONOV (1968), celle de l'activité estérase par la méthode de SCANDALIOS (1964). Après décoloration des gels on établit les profils électrophorétiques soit visuels soit densitométriques, ces derniers étant obtenus à 475 nm au moyen d'un densitomètre Gelmann DCD-16. Comme pour les protéines totales (MASA, 1985 a) on calcule les mobilités électrophorétiques relatives (REM) de chaque bande isoenzymatique par rapport à la mobilité du bleu de bromophénol utilisé comme marquant du front de migration. On calcule ensuite les valeurs des coefficients d'affinité pour chaque association variété-greffon à partir des valeurs des (REM) issues des profils électrophorétiques, à la fois visuels et densitométriques ; il a semblé, en effet, intéressant de comparer ces deux origines car aucune donnée ne permettait jusqu'à présent de choisir les résultats d'un profil plutôt que ceux d'un autre, en particulier en ce qui concerne la précision des résultats. On définit les coefficients d'affinité entre variété et porte-greffe ($K_{V-PG}$) et entre porte-greffe et variété ($K_{PG-V}$) en accord avec les travaux de SAFONOV et VEIDENBERG (1969) et en utilisant les formules suivantes :

$$K_{V-PG} = \frac{\text{Protéines communes}}{\text{Protéines totales de la variété}} \times 100$$

$$K_{PG-V} = \frac{\text{Protéines communes}}{\text{Protéines totales du porte-greffe}} \times 100$$

Ce sont ces valeurs des coefficients d'affinité qui permettent de conclure à la présence ou à l'absence d'affinité entre les diverses associations végétales étudiées.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I — PHOSPHATASE ACIDE

L'analyse de la phosphatase acide des différents extraits montre qu'il existe quatre profils électrophorétiques différents, variables selon les variétés et les porte-greffes considérés (figure 1), les deux derniers profils étant communs à la fois à certaines variétés et à certains porte-greffes ; aucun développement coloré n'a pu être mis en évidence dans le cas de l'échantillon de 196-17 C. L'existence de ces quatre compositions isoenzymatiques est confirmée par les valeurs de REM calculées à partir des profils densitométriques (tableau I) ; celles-ci sont identiques à celle de la figure 1. Si l'on exprime ces résultats sous forme de coefficients d'affinité (tableau II) on peut en déduire qu'il existe une affinité très nette entre les variétés Airén, Grenache, Tempranillo, Maccabeo et le porte-greffe 161-49, de même qu'entre la variété Bobal et les porte-greffes 110-R et 41-B. En outre, et même si cela n'est confirmé que par les profils isoenzymatiques visuels, ont peut également conclure à l'existence d'affinité entre les variétés Airén, Maccabeo, Grenache et Tempranillo et les porte-greffes 41-B et 110-R.

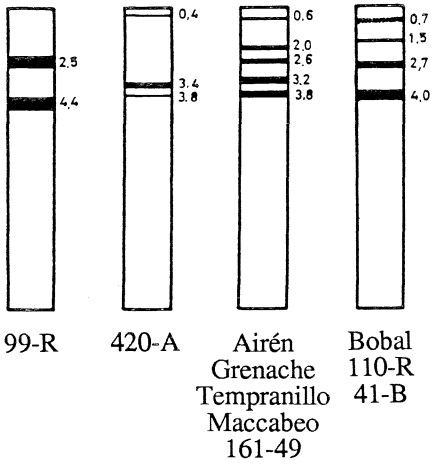



Fig. 1 — Profil électrophorétique visuel de la phosphatase acide des variétés et des porte-greffes étudiés.

Si l'on compare (tableau III) les valeurs des coefficients d'affinité avec ceux obtenus par ailleurs à partir du dosage des protéines totales (MASA, 1985 a) on peut observer que les deux séries de résultats coïncident parfaitement, exception faite de l'association Airén/41-B jugée précédemment sans affinité et de Tempranillo qui présentait aussi une affinité protéique meilleure avec 110-R qu'avec 161-49. Il y a également pour 420-A et 99-R

une très bonne coïncidence entre les résultats obtenus à partir de l'analyse des phosphates acides et ceux issus de l'analyse des protéines totales. Dans les deux cas on a un manque d'affinité entre ces deux porte-greffes et les variétés étudiées.

## TABLEAU I

**Valeurs des mobilités électrophorétiques relatives des izoenzymes de phosphatase acide de diverses variétés de *Vinifera* et de porte-greffes. (Les calculs ont été effectués à partir des profils densitométriques et les valeurs sont multipliées par 10).**

| Variété ou porte-greffe | Valeurs des mobilités électrophorétiques relatives (REM) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Airén | 0,6 | 1,7 | 2,1 | 2,7 | 3,5 | 3,7 | — |
| Grenache | 0,6 | 1,6 | 2,2 | 2,6 | 3,3 | 3,9 | — |
| Tempranillo | 0,5 | 1,7 | 2,2 | 2,8 | — | 3,8 | — |
| Maccabeo | 0,6 | 1,6 | 2,1 | 2,6 | — | 3,6 | — |
| 161-49 | 0,6 | 1,7 | 2,2 | 2,6 | — | 3,8 | — |
| Bobal | 0,6 | 1,8 | — | — | 3,6 | — | 4,3 |
| 110-R | 0,8 | 1,9 | — | 2,8 | 3,5 | — | 4,2 |
| 41-B | 0,7 | 1,8 | 2,2 | — | 3,6 | — | — |
| 420-A | 0,3 | — | 2,0 | — | 3,2 | 3,6 | — |
| 99-R | — | — | — | 2,6 | — | — | 4,3 |

## II — PHOSPHATASE ALCALINE

La figure 2 rassemble les profils isoenzymatiques obtenus après électrophérèse de la phosphatase alcaline des extraits des variétés et porte-greffes étudiés et le tableau VI des valeurs des REM calculées à partir des profils densitométriques. Comme dans le cas de la phosphatase acide, 196-17-C n'a donné aucun profil isoenzymatique. Si l'on compare (tableau II) les valeurs des coefficients d'affinité obtenues pour chaque association variété/porte-greffe, on peut conclure à une affinité marquée entre Maccabeo et 99-R, Bobal et 41-B, Airén et 161-49 et 110-R, Grenache et Tempranillo et 110-R. Une affinité apparaît également entre Airén et 41-B et 99-R, Bobal et 110-R et 161-49, Grenache et 41-B, 161-49 et 420-A, Tempranillo et 41-B, 161-49 et 99-R, même si l'on ne peut déduire ces résultats que de seulement deux valeurs des coefficients d'affinité.

**Valeurs des coefficients d'affinité des diverses associations variété/porte greffe. A : Airén ; B : Bobal ; G : Grenache ; T : Tempranillo ; M : Maccabeo.**

**$K_{PG-V}$ : coefficient d'affinité porte-greffe/varieté — $K_{V-PG}$ : coefficient d'affinité variété/porte-greffe**

| | Valeurs des coefficients d'affinité | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | obtenues à partir des profils visuels | | | | | | obtenues à partir des profils densitométriques | | | | | |
| | | $K_{PG-V}$ | | | $K_{V-PG}$ | | | $K_{PG-V}$ | | | $K_{V-PG}$ | |
| Association | Phosphatases acides | Phosphatases alcalines | Peroxydases | Phosphatases acides | Phosphatases alcalines | Peroxydases | Phosphatases acides | Phosphatases alcalines | Peroxydases | Phosphatases acides | Phosphatases alcalines | Peroxydases |
| A/120-A | 20 | 40 | 100 | 33 | 50 | 100 | 33 | 33 | 0 | 50 | 40 | 0 |
| A/41-B | 60 | 80 | 100 | 75 | 80 | 100 | 66 | 33 | 0 | 100 | 40 | 0 |
| A/99-5 | 20 | 60 | 20 | 50 | 100 | 50 | 16 | 33 | 0 | 50 | 66 | 0 |
| A/110-R | 60 | 80 | 80 | 75 | 80 | 100 | 33 | 50 | 80 | 40 | 100 | 80 |
| A/161-49 | 100 | 100 | 20 | 100 | 100 | 50 | 83 | 50 | 0 | 100 | 75 | 0 |
| A/196-17C | — | — | 20 | — | — | 30 | — | — | 20 | — | — | 25 |
| B/420-1 | 25 | 40 | 100 | 33 | 50 | 80 | 25 | 75 | 0 | 25 | 60 | 0 |
| B/41-B | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 80 | 75 | 100 | 0 | 75 | 80 | 0 |
| B/99-5 | 0 | 60 | 25 | 0 | 100 | 50 | 25 | 25 | 0 | 50 | 33 | 0 |
| B/110-5 | 100 | 80 | 100 | 100 | 80 | 100 | 75 | 50 | 75 | 60 | 40 | 60 |
| B/161-49 | 75 | 80 | 25 | 60 | 80 | 50 | 40 | 50 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| B/196-17C | — | — | 0 | — | — | 0 | — | — | 25 | — | — | 25 |
| G/420-A | 20 | 60 | 26 | 33 | 75 | 20 | 16 | 66 | 0 | 25 | 80 | 0 |
| G/41-B | 60 | 80 | 16 | 75 | 80 | 20 | 33 | 50 | 20 | 50 | 60 | 25 |
| G/99-R | 20 | 60 | 0 | 50 | 100 | 0 | 16 | 16 | 20 | 50 | 33 | 50 |
| G/110-R | 60 | 80 | 0 | 75 | 80 | 0 | 0 | 50 | 40 | 0 | 66 | 40 |
| G/161-49 | 100 | 80 | 0 | 100 | 80 | 0 | 83 | 33 | 20 | 100 | 50 | 33 |
| G/196-17C | — | — | 16 | — | — | 33 | — | — | 0 | — | — | 0 |
| T/420-A | 20 | 60 | 0 | 33 | 75 | 0 | 0 | 20 | 50 | 0 | 20 | 40 |
| T/41-B | 60 | 80 | 0 | 75 | 80 | 0 | 40 | 40 | 25 | 50 | 40 | 25 |
| T/99-R | 20 | 60 | 50 | 50 | 100 | 50 | 20 | 40 | 0 | 50 | 66 | 0 |
| T/110-R | 60 | 80 | 0 | 75 | 80 | 0 | 20 | 40 | 50 | 20 | 66 | 40 |
| T/161-49 | 100 | 80 | 50 | 100 | 80 | 50 | 80 | 40 | 25 | 80 | 50 | 33 |
| T/196-17C | — | — | 0 | — | — | 0 | — | — | 0 | — | — | 0 |
| V/420-A | 20 | 33 | 83 | 33 | 20 | 100 | 40 | 33 | 0 | 50 | 20 | 0 |
| V/41-B | 60 | 60 | 83 | 75 | 100 | 100 | 60 | 66 | 20 | 75 | 40 | 25 |
| V/99-R | 20 | 100 | 16 | 50 | 100 | 50 | 20 | 100 | 0 | 50 | 100 | 0 |
| V/110-5 | 60 | 66 | 66 | 75 | 40 | 100 | 20 | 0 | 40 | 20 | 0 | 40 |
| V/161-49 | 100 | 100 | 16 | 100 | 60 | 50 | 80 | 33 | 20 | 80 | 25 | 33 |
| V/196-17C | — | — | 16 | — | — | 33 | — | — | 0 | — | — | 0 |

## TABLEAU III

**Comparaison de l'affinité et de la non-affinité des diverses associations porte-greffe/variété définies soit à partir de l'étude des isoenzymes soit à partir de celle des protéines totales (les estérases n'ont pas été retenues).**

| Variété | Protéines totales | | Phosphotases acides | | Phosphotases alcalines | | Peroxidases | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Affinité | Non-affinité | Affinité | Non-affinité | Affinité | Non-affinité | Affinité | Non-affinité |
| Airén | 196-17C<br>161-49<br>110-R | 420-A<br>41-B | 161-49<br>41-B<br>110-R | 420-A<br>99-R | 161-49<br>110-R<br>41-B | 420-A | 110-R<br>41-B<br>420-A | 99-R<br>196-17C<br>161-49 |
| Bobal | 110-R<br>41-B<br>161-49 | 420-A<br>196-17C | 110-R<br>41-B<br>161-49 | 420-A<br>99-R | 41-B<br>110-R<br>161-49 | 420-A | 110-R<br>41-B<br>420-A | 99-R<br>196-17C<br>161-49 |
| Grenache | 161-49<br>41-B | 196-17C<br>420-A | 161-49<br>41-B<br>110-R | 420-A<br>99-R | 110-R<br>161-49<br>41-B | | | 420-A<br>161-49<br>99-R |
| Tempranillo | 110-R<br>41-B<br>161-49 | 420-A<br>99-R<br>196-17C | 161-49<br>41-B<br>110-R | 420-A<br>99-R | 110-R<br>41-B<br>161-49 | | | 196-17C |
| Maccabeo | 161-49<br>41-B<br>196-17C | 420-A | 161-49<br>41-B<br>110-R | 420-A<br>99-R | 99-R<br>161-49 | 420-A<br>110-R | 41-B<br>420-A | 99-R<br>196-17C |

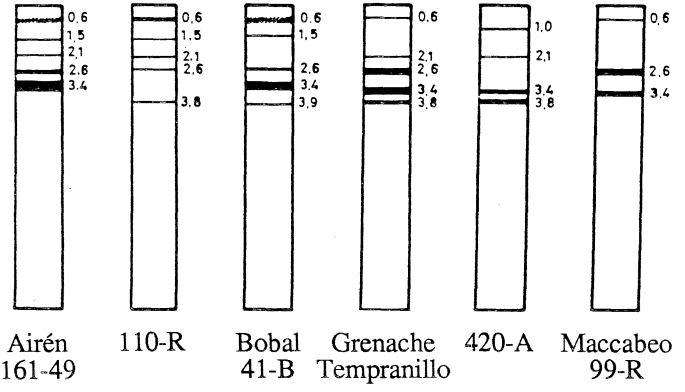



Fig. 2 — Profil électrophorétique visuel de la phosphatase alcaline des variétés et des porte-greffes étudiés.

## TABLEAU IV

**Valeurs des mobilités électrophorétiques relatives des izoenzymes de phosphatase alcaline de diverses variétés de *Vinifera* et de porte-greffes. (Les calculs ont été effectués à partir des profils densitométriques et les valeurs sont multipliées par 10).**

| Variété ou porte-greffe | Valeurs des mobilités électrophorétiques relatives (REM) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Airén | 0,6 | 1,0 | 1,5 | 2,1 | 2,6 | 3,4 | — |
| 161-49 | 0,5 | — | 1,5 | — | 2,4 | 3,5 | — |
| Bobal | 0,7 | — | 1,3 | — | 2,4 | 3,4 | — |
| 41-B | 0,6 | — | 1,2 | 2,3 | — | 3,5 | 3,9 |
| Grenache | 0,7 | — | 1,4 | 2,0 | 2,7 | 3,4 | 3,9 |
| Tempranillo | 0,5 | 1,0 | — | 2,1 | 2,6 | 3,6 | — |
| 110-R | — | 0,9 | 1,5 | — | 2,6 | — | — |
| 420-A | 0,8 | — | 1,3 | 2,0 | — | 3,4 | 4,1 |
| Maccabeo | 0,7 | — | — | 2,3 | — | 3,2 | — |
| 99-R | 0,6 | — | — | 2,2 | — | 3,2 | — |

Certaines autres valeurs, cependant, sont particulièrement faibles, en particulier pour les associations Airén et Tempranillo et 99-R. Ces résultats sont tout à fait semblables à ceux de la phosphatase acide ce qui a également pour conséquence une similitude avec ceux issus du dosage des protéines totales (tableau III). Sans doute rencontre-t-on certains cas où l'association porte-greffe-variété ne suit pas ces conclusions, par exemple Maccabeo/99-R, dont les éléments, sans affinité selon les résultats obtenus à partir de la phosphatase acide, sont jugés de façon contraire selon ceux obtenus à partir de la phosphatase alcaline ; inversement, Mac-

cabeo/110-R, sans affinité selon ces dernières peut être jugé en sens contraire selon les premières.

Enfin, il se confirme également que 420-A n'a aucune affinité avec la majorité des variétés étudiées.

III — PEROXYDASE

La figure 3 rassemble les résultats des électrophorèses de la peroxydase des extraits issus des variétés et porte-greffes étudiés et le tableau V les valeurs correspondantes des REM, obtenus à partir des profils densitométriques. Parallèlement, les coefficients d'affinité obtenus à partir des deux types de profils sont donnés dans le tableau II. Ceux-ci montrent qu'il existe une bonne affinité entre Airén, Bobal et le porte-greffe 110-R et,

**TABLEAU V**

**Valeurs des mobilités électrophorétiques relatives des izoenzymes de peroxydase de diverses variétés de *Vinifera* et de porte-greffes.**
**(Les calculs ont été effectués à partir des profils densitométriques et les valeurs sont multipliées par 10).**

| Variété ou porte-greffe | Valeurs des mobilités électrophorétiques relatives (REM) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Airén | 0,5 | 1,3 | 2,5 | 3,3 | 4,7 | — | — |
| 110-R | 0,5 | 1,2 | 2,4 | 3,4 | 4,4 | — | — |
| 420-A | 0,8 | 1,5 | 2,0 | 3,1 | 4,4 | — | — |
| Bobal | — | 1,3 | 2,5 | 3,5 | 4,6 | — | — |
| 41-B | 0,7 | 1,6 | 2,8 | — | 4,3 | — | — |
| Maccabeo | 0,6 | 1,3 | 2,6 | — | 4,6 | — | 6,7 |
| Tempranillo | 0,6 | — | 2,6 | 3,2 | 4,5 | — | — |
| Grenache | — | 1,1 | — | 3,3 | 4,2 | 6,1 | 6,5 |
| 196-17C | 0,9 | — | 2,4 | 3,8 | — | 6,3 | — |
| 161-49 | 0,7 | — | 2,8 | — | 4,3 | — | — |
| 99-R | — | — | 2,3 | — | 4,2 | — | — |

à un moindre degré, entre Airén, Bobal, Maccabeo et les porte-greffes 420-A et 41-B dont les coefficients ont été calculés à partir des seuls profils électrophorétiques visuels. Comme le montre le tableau III ces résultats coïncident dans quelques cas (Airén/110-R, Bobal/110-R et 41-B, Maccabeo/41-B) avec ceux obtenus à partir des protéines totales. Cependant, dans beaucoup d'autres cas, ils sont contradictoires ; par exemple, des associations comme Airén/420-A et 41-B, Bobal/420-A, Maccabeo/110-R et 420-A présentent ici une affinité alors que cela n'est pas le cas selon les résultats obtenus avec les protéines totales. Il convient

toutefois de remarquer que les résultats relatifs aux associations sans affinité sont moins précis que ceux des associations avec affinité.

En ce qui concerne les variétés Grenache et Tempranillo on ne peut conclure nettement ni à leur affinité ni à leur non-affinité avec les porte-greffes étudiés ; les très faibles valeurs des coefficients d'affinité tendraient cependant à montrer une absence d'affinité générale. Le tableau III indique les cas où celle-ci est particulièrement nette.

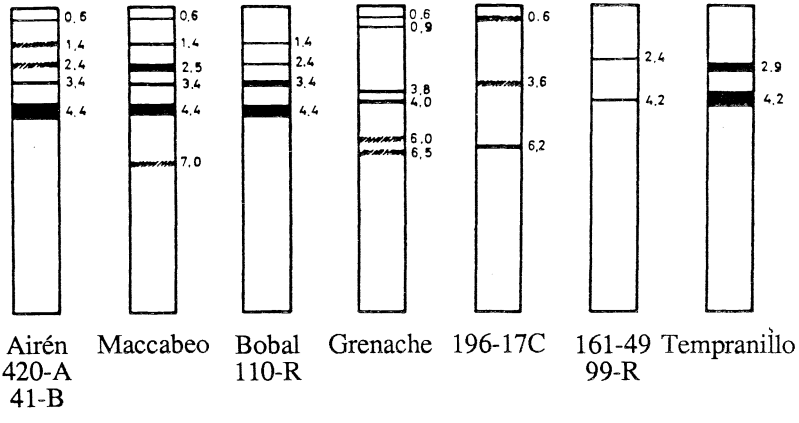



Fig. 3 — Profil électrophorétique visuel de la péroxydase des variétés et des porte-greffes étudiés.

## IV — ESTERASE

Les résultats du tableau II obtenus à partir des profils électrophorétiques visuels et densitométriques ne permettent pas de conclure à une compatibilité ou incompatibilité entre variétés et porte-greffes. Comme le montre la figure 4 chaque extrait possède son profil propre ; les valeurs des REM obtenues avec les profils densitométriques (tableauVI) ne permettent donc aucune conclusion. Aucun profil n'a également pu être obtenu pour la variété Grenache et les porte-greffes 420-R et 110-R.

Outre les résultats relatifs à chacune des enzymes étudiées, il apparaît de façon générale, une forte affinité intrinsèque entre les porte-greffes 41-B et 110-R ainsi qu'une forte non-affinité intrinsèque entre le porte-greffe 420-A et les variétés étudiées. Ces résultats, précédemment mis en évidence par MASA (1985 a et b) au moyen de la technique des protéines totales, sont en accord avec ceux de HILDAGO et CANDELA (1979).

En ce qui concerne le choix des profils électrophorétiques visuels ou densitométriques dans le calcul des coefficients d'affinité, il apparaît que les valeurs de ceux-ci sont plus faibles quand elles sont calculées à partir des profils du deuxième type. Cette différence culmine dans le cas de la peroxydase, où Airén, Bobal, Maccabeo 420-A et 41-B sont jugés comme présentant ou non une affinité selon qu'on prend en compte les coefficients

## TABLEAU VI

**Valeurs des mobilités électrophorétiques relatives des izoenzymes d'estérase de diverses variétés de *Vinifera* et de porte-greffes.**
**(Les calculs ont été effectués à partir des profils densitométriques et les valeurs sont multipliées par 10).**

| Variété ou porte-greffe | Valeurs de mobilités électrophorétiques relatives (REM) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Airén | 0,2 | 1,2 | — | 2,0 | — | 3,6 | 4,3 | 5,6 | 6,2 | — | — |
| Bobal | — | — | 1,5 | 2,3 | 3,0 | — | 4,1 | — | 6,0 | — | — |
| Tempranillo | 0,4 | 1,0 | — | — | — | — | 4,3 | 5,1 | — | — | — |
| Maccabeo | 0,3 | 0,7 | 1,6 | 2,1 | 2,8 | 3,4 | 4,3 | 5,2 | — | — | — |
| 99-R | — | — | — | — | 3,1 | — | — | 5,0 | 6,5 | 7,1 | 8,5 |
| 41-B | — | 0,8 | 1,8 | — | — | — | 4,2 | — | — | — | — |
| 161-49 | — | 0,9 | 1,3 | 2,2 | 3,0 | — | 4,0 | 5,3 | — | — | — |
| 196-17C | 0,4 | 1,1 | — | 2,3 | — | — | 4,1 | — | 6,5 | — | — |

obtenus avec l'un ou l'autre des profils électrophorétiques. Les profils densitométriques pourraient être jugés moins bons étant donné que les résultats obtenus avec les profils visuels montrent une meilleure concordance avec ceux issus des déterminations des protéines totales. Ceci demande toutefois à être confirmé et, en l'état actuel de nos travaux, il n'est pas possible de choisir un profil plutôt qu'un autre.

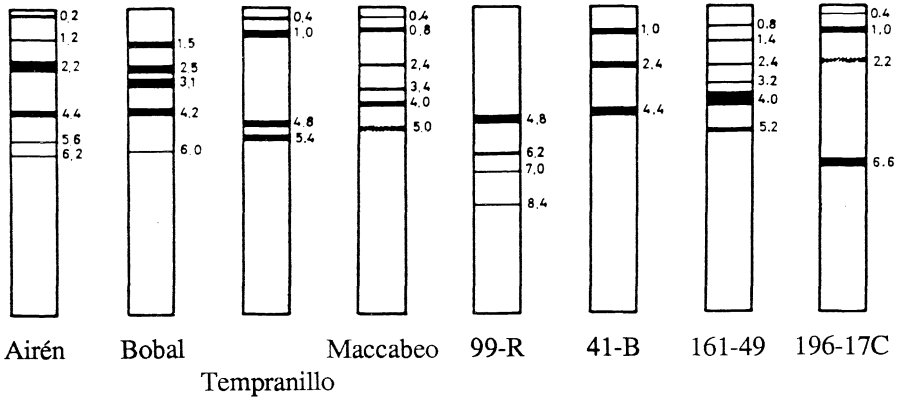



Fig. 4 — Profil électrophorétique visuel de l'estérase des variétés et des porte-greffes étudiés.

## CONCLUSIONS

L'étude de la structure isoenzymatique de quelques enzymes d'extraits de sarments provenant de variétés de *vinifera* et de porte-greffes s'avère particulièrement intéressante dans la définition d'affinités biochimiques entre greffons et variétés. De façon générale, cette étude affinée à certains enzymes confirme les résultats de travaux précédents utilisant la technique plus générale de la détermination des protéines totales. Cependant, si l'on compare les chiffres obtenus au moyen des deux méthodes il apparaît que la prise en compte de certaines enzymes est plus intéressante que celle d'autres. Si les phosphatases, acides ou alcalines, sont en particulier d'un grand intérêt, cela est moins net pour la peroxydase qui donne des résultats particulièrement contradictoires avec ceux obtenus par les protéines totales et les phosphatases ; ceci n'est pas en accord avec les conclusions de certains auteurs (COPES, 1978, QUESSADA et MACHEIX, 1984) qui notent une corrélation très nette entre l'absence d'affinité entre variété et porte-greffe et celle d'isoenzymes particulières de la peroxydase. Il est possible que dans nos essais il y ait eu des interférences dues à une infection virale entraînant de profondes modifications de profils proxydasiques lors de l'électrophorèse. En effet, l'activité de cette enzyme est connue pour être impliquée dans les mécanismes de défense des végétaux vis-à-vis des agents pathogènes (GASPAR et *al*, 1982). Ceci est d'autant plus plausible que nous avons utilisé du matériel végétal non certifié d'un point de vue sanitaire ; à ce titre, une comparaison avec des plants certi-

fiés serait intéressante. Enfin, la prise en compte de l'estérase n'apparaît d'aucune utilité dans la détermination de la présence ou non d'une affinité entre *vinifera* et porte-greffes.

*Remerciements*

*Nous adressons nos vifs remerciements au Professeur D. Luis HIDALGO y FERNANDEZ-CANO, Directeur du Département de Viticulture-Œnologie du CRIDA 06 (INIA), à la fois pour la fourniture du matériel végétal utilisé ainsi que pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués tout au long de ce travail.*

Manuscrit reçu le 17 juillet 1985 ; accepté pour publication le 8 décembre 1985.

## RESUME

Dans le but de compléter la méthode biochimique de détermination de l'affinité entre *Vitis vinifera* et porte-greffe, on étudie, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, le profil isoenzymatique de quatre systèmes enzymatiques (phosphatases acide et alcaline, peroxydase et estérase) chez cinq variétés et six porte-greffes. A partir des mobilités électrophorétiques relatives le calcul des valeurs des coefficients d'affinité permet d'établir, pour chaque enzyme, une relation d'affinité ou de non-affinité des diverses associations *vinifera*-porte-greffes. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus à partir des dosages de protéines totales. Les phosphatases acide et alcaline apparaissent les plus adaptées pour la détermination de l'affinité variété-porte-greffe.

## SUMMARY

In order to complete the biochemical method for determination of scion roots-stock affinity in grape a new approach is proposed such as the study and comparison of isoenzymatic structure of some scions and rootstocks enzymes. Acidic and alkaline phosphatases, peroxidase and esterase of five *Vitis vinifera* and six rootstocks were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis. Relative electrophoretic mobilities of the different isoenzymatic bands were calculated. After comparing the zymogram banding patterns it was concluded that this new approach was valid. Evidence occured that acidic and alkaline phosphatases were the most useful for determining the scion-rootstock affinity. Results were in agreement with those previously obtained according to protein determinations.

## ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem Ziel die biochemische Methode zu vervollständigen, um die Ahnlichkeit zwischen *Vitis vinifera* und dem nicht edligen Pfropfträger zu bestimmen, wird das isoenzymatische Profil von vier enzymatischen Systemen (saure und alkalische Phosphatase, Peroxydase und Esterase) bei füng Verschiedenheiten und sechs Pfropfträgern studiert. Die Studie wird durch eine Elektrophorese bei Einfrieren der Polyakrylamide aufgestellt.

Ausgehend von der relativen lektrophoretischen Beweglichkeit, erlaubt die Berechnung der werte des Ahnlichkeitskoeffizienten für jedes Enzym das Aufstellen einer Verwandtschafsbeziehung oder Nicht verwandtschaftsbeziehung zwischen *Vinifera* und Pfropfträfer.

Diese Ergebnisse werden mit zwei schon erhaltenen verglichen, ausgehend von der Dosierung der ganzen Eiweiße.

Die sauren und alkalischen Phosphatase erscheinen dabei am besten geeignet zur Bestimmung der Ahnlichkeit.

## RESUMEN

Se propone el estudio de diferentes sistemas enzimáticos de injertos y patrones como una forma de completar el método bioquímico de déterminación de la afinidad viníferaportainjerto en vid.

Se han extraido e identificado por electroforesis en geles de acrilamida las fosfatasas ácidas, alcalinas, peroxidasas y esterasas de 5 variedades de *vitis vinifera L.* (Airén, Bobal, Garnacha, Tempranillo, Viura) y de 6 portainjertos (420-A, 41-B, 99-R, 110-R, 161-49, 196-17 C). Para las diférentes bandas isoenzimáticas se han calculado las movilidades electroforéticas relativas, y a partir de ellas los coeficientes de afinidad para cada una de las combinaciones injerto-patron estudiadas. Se comparan estos resultados con aquellos reseñados previamente para proteinas totales y se observa la validez del método propuesto, y que son las fosfatasas los enzimas más útiles de entre los estudiados para determinar la afinidad injertopatrón de una combinación dada.

## RIASSUNTO

Per completare il metodo biochimico di determinazione dell'affinità tra *vitis vinifera* e portinnesto, studiamo con elettroforesi su gelo di « poliacrilamide », il profilo isoenzimatico di quattro sistemi enzimatici (fosfatasi acidi ed alcaline, peroxidasi ed esterasi) in cinque varietá e sei portinnesti. A partire dalle mobilità elettroforetiche relative, il calcolo dei valori dei coefficienti di affinità permette di fare per ogni enzima una relazione d'affinità o di non affinità delle diverse associazioni vinifera-portinnesto. Questi risultati sono paragonati a quelli ottenuti a partire del dosaggi delle proteine totali. Le fosfatasi acidi ed alcaline sembrano le più adatte per la determinazione dell'affinità varietà-portinnesto.


## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


ADAMS W.T., 1983. Application of isozymes in tee breeding. *In* : TANKSLEY S.D. et ORTON T.J. (Ed.) : Isozymes in plant genetics and breeding. Part A, 381-400 Elsevier, Amsterdam.

BASSIRI A. et ADAMS M.W., 1978. Evaluation of common bean cultivar relationships by means of isozyme electrophoretic patterns. *Euphytica,* 27, 707-720.

BURDON J.J. et MARSHALL D.R., 1983. The use of isozymes in plant disease research. *In* : TANKSLEY S.D. et ORTON T. J. (Ed.) : Isozymes in plant genetics and breeding. Part A, 401-412. Elsevier, Amsterdam.

COPES D.L., 1978. Isoenzyme activities differ in compatible and incompatible Douglas-fir graft unions. *Forest Sci.*, 24, 297-303.

DAVIS B.J., 1964, Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 121,* 404-427.

GABRIEL O., 1971. Analytic al disc gel electrophoresis. *In* : JAKOBY W.B., (Ed.) : Methods in Enzymology, 22, 565-578. Academic Press, New York.

GASPAR Th., PENEL C 1., THORPE T et GREPPIN H., 1982. Peroxidases 1970-1980. A survery of their biochemical and physiological roles in higher plants. 342 pp. Université de Genève.

HIDALGO L., 1981. Cuarta comunicación sobre afinidad y adaptación de portainjertos y viníferas. *Anales del instituto Nacional de Investigaciones Agrarías.* Serie Agrícola, 14, 95-249.

HIDALGO L., 1983. Quinta comunicación sobre afinidad y adaptación de portainjertos y viníferas. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarías.* Serie Agricola, 24, 55-209.

HIDALGO L. et R-CANDELA M., 1979. Contribución al estudio de la afinidad intrínseca de portainjertos y viníferas. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarías.* Serie Producción Vegetal, 9, 241-280.

LOUKAS M. STAVRAKAKIS M.N. et KRIMBAS C.B., 1983. Inheritance of polymorphic isoenzymes in grape cultivars. *J. Heredity, 74,* 181-183.

MASA A., 1985 a. Método bioquimíco de determinación de la afinidad entre injerto y patrón en vid. *Vitis,* 24, 12-16.

MASA A., 1985 b. La compatibilidad proteica : un posible método para precedir la afinidad entre injerto y patrón en vid *(Vitis vinifera* L.*). Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarías.* Serie Agricola (sous presse).

MOORE R. et WALKER D.B., 1981. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. III. The involvement of acid phosphotase in the lethal cellular senescence associated with an incompatible heterograft. *Protoplasma, 109,* 317-334.

ORTON T.J., 1983. Application of isozyme technology in breeding cross-pollinated crops. *In* : TANKSLEY S.D. y ORTON T.J., (Ed.) : Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. 363-376. Elsevier, Amsterdam.

PALLAVICINE C., 1971. Proteine solubili e isoenzimi della perossidasi, fosfatisi acida, amilasi, invertasi, fenolasi, esterasi e catalasi delle bucce e dei succhi di sei uve. *Industrie Agrarie, 9,* 301-310.

QUESSADA M.P. et MACHEIX J.J., 1984. Caractérisation d'une peroxydase impliquée spécifiquement dans la lignification, en relation avec l'incompatibilité au greffage chez l'abricotier. *Physiol. Vég., 22,* (5), 533-540.

SAFONOV V.I. et VEIDENBERG A.E., 1969. Prognosis of scion-stock physiological incompatibility in apple by determination of proteins spectra. *Doklady Akademii Nauk SSSR, 186,* (4), 978-980.

SCANDALIOS J.G., 1964. Tissue-specific isozyme variations in maize. *J. Heredity, 55,* 281-285.

SHANNON M.C., BALLAL S.K. et HARRIS J.W., 1973. Starch gel electrophoresis of enzymes from nine species of *Polyporus. Amer. J. Bot., 60,* 96-100.

VEIDENBERG A.E. et SAFONOV V.I., 1968. Characteristics of the composition of the enzyme protein complex of the pollen of different species and varieties of apple trees. *Doklady Akademii Nauk SSSR. 180,* (5), 1242-1245.

WOLFE W.H., 1976. Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *Am. J. Enol. Viticult. 27,* 68-73.