

# THE IDENTIFICATION OF CLONES WINE VARIETIES BY ENZYMATIC ANALYSIS

## L'IDENTIFICATION DES CLONES DES VARIÉTÉS DE VIN PAR ANALYSE ENZYMATIQUE

**ROTARU LILIANA**

University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iași

**Abstract.** The authors applied the isoenzymatic analysis of peroxydase (E.C. 1.11.1.7) by disk-electrophoresis to a clones a Sauvignon grapevine cultivars of *Vitis vinifera* L., with a view to identifying the "proteic fingerprint" of each clones. Between 3 and 7 bands with peroxydase activity were identified and the zymograms characterizing each grapevine clones were established. These then helped establish the genetic relations among the Sauvignon clones grapevine and verify hypotheses concerning the existence of similitude of native cultivar.

**Rezume.** Les auteurs ont appliqué l'analyse isoenzymatic de la peroxydase (E.C. 1.11.1.7) par l' disque-électrophorèse à les clones des cultivars Sauvignon, en vue d'identifier "la copie proteic" de chacun clone. Entre 3 et 7 bandes avec de la peroxydase l'activité ont été identifiées et les zymograms caractérisant chaque clones ont été établis. Ceux-ci alors aidés à établir les relations génétiques parmi le Sauvignon clones et vérifie des hypothèses au sujet de l'existence de la similitude du cultivar.

La variance génétique des cultivars de vigne peut être indiqué en étudiant les produits chimiques de base des enzymes. L'activité des enzymes dans les extraits proteic obtenus à partir des jeunes feuilles des cultivars peut être démontrée par leur action catalytique, impliquant le dégagement des produits finals de varior (Bénin et le colab., 1988). Puisque l'activité catalytique des enzymes peut être les résultats de plusieurs protéines, le terme "isoenzymes" a été présenté, qui peut être distingué par les différences dans leur activité (Subden R.E. et colab., 1987). Les isoenzymes de Peroydases incluent un grand groupe d'enzymes spécifiques, comme : la NAD-peroxydase, la NADP-peroxydase, la cytochrome-peroxydase, la glutation-peroxydase et d'autres, leur nomenclature systématique étant ce donneur d'hydrogen le donneur de peroxyde du code E.C.1.11.1.7 ou "du hydron" ( $H_2O_2$ -reductase). Dans une analyse des isoenzymes peroxidases clones dedans de Sauvignon au moyen de l'électrophorèse que les zymograms caractéristiques du clone ont été obtenus, qui a permis le traçage de leurs rapports génétiques.

### MATÉRIEL ET MÉTHODE

On étudié les clones qui ont été obtenu en Roumanie de Sauvingnon: Sauvingnon – 9 Bl, Sauvignon – 62 Dg et Sauvignon – 111 St.

La matière employée était de jeunes feuilles des pousses principales, rassemblées au début de juin. Les feuilles étaient mortier rectifié et homogénéisé dans une solution tampon de Tris-glycérine de pH 8.3, rapport de 1 : 2.

C'était centrifugé alors pendant 10 minutes à 3000 rot/min, la température 4°C. Les supernatants ont résulté de la décantation ont été plus tard frigorifiés à 4°C jusqu'à l'électrophorèse.

Les isoenzymes de séparation ont été faites par l'électrophorèse dans des tubes verticaux remplis de solution tampon de gel et de Tris-glycérine de polyacrylamide de 5% (5 mM + 38 mM). L'électrophorèse a été conduite pendant 90 minutes dans un domaine électrostatique de 250 V à une température de 4°C, jusqu'à ce que le mouvement bleu d'indicateur de migration de fenol de brome 8 centimètres. La benzidine a été employée comme réactif pour indiquer les bandes de protéine avec l'activité peroxidasic.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les clones étudiés sont caractérisés par 3 à 7 bandes électrophorétiques avec l'activité peroxidasic (tableau 1). À leur position dans le gel, ceux-ci étaient conformes séparé à un de deux groupes :

- les bandes anodiques avec la migration rapide, démontrée dans tous les clones ;
- les bandes catodiques avec la migration moyenne (lente ou réduite), utilisée pour l'identification de clones.

*Tableau 1*  
**Spectre d'Isoenzymatic de peroxydase dans les clones roumains de Sauvignon**

| Genotype             | Nombre de bandes proteic | Intensité d'activité isoenzymatic : |     |     |    |     |    |    |
|----------------------|--------------------------|-------------------------------------|-----|-----|----|-----|----|----|
|                      |                          | P1                                  | P2  | P3  | P4 | P5  | P6 | P7 |
| Sauvignon-population | 6                        | ++                                  | +++ | ++  | ++ | +++ | ++ | -  |
| Sauvignon – 9 Bl     | 7                        | ++                                  | +++ | +++ | ++ | ++  | ++ | +  |
| Sauvignon – 62 Dg    | 5                        | -                                   | +++ | ++  | ++ | +   | +  | -  |
| Sauvignon – 111 St   | 3                        | -                                   | +++ | ++  | ++ | -   | -  | -  |

Légende :

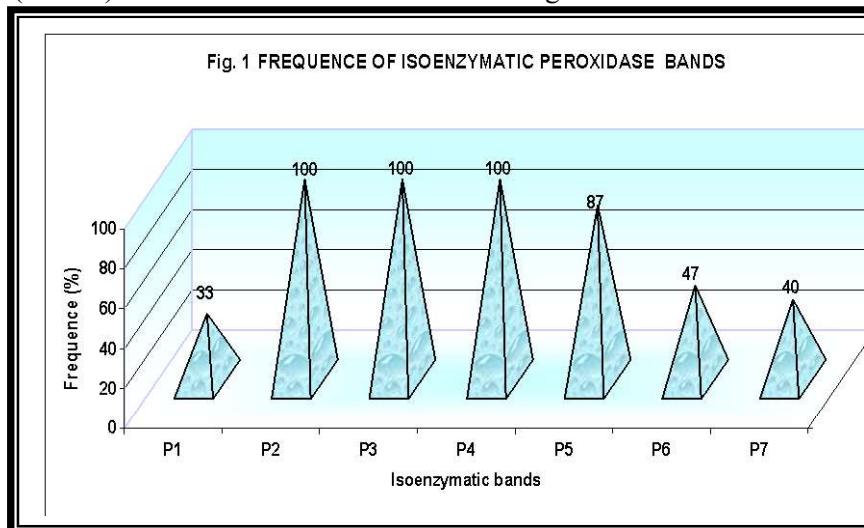
- absence de bande proteic ;
- + bas activité enzymatique ;
- ++ activité enzymatique moyenne ;
- +++ activité enzymatique élevée.

Les bandes isoperoxidasic démontrent le polymorphisme considérable en ce qui concerne leur nombre et le placement dans le gel et à l'intensité variable de la couleur. Les clones étudiés démontrent des spectres enzymatiques composés de 3 à 7 bandes peroxidasic, avec des fréquences changeant entre 33 et 100% (fig. 1).

Leur analyse a donné les résultats suivants :

- la bande P1 proteic avec l'activité peroxidasic moyenne et fréquence de 33% (la plus basse) a caractérisé seulement les clones suivants : Sauvignon -9 Bl ;

- la bande P2 proteic avec l'activité et la fréquence peroxidasic très intenses 100% a caractérisé tous les clones étudiés ;
- la bande P3 proteic avec moins d'activité peroxidasic intense et 100% fréquences (de haute) a également caractérisé tous les clones étudiés. Le clone Sauvignon – 9 Bl démontrent également l'intensité enzymatique élevée ;
- la bande P4 proteic avec l'activité et la fréquence 100% peroxidasic moyennes a caractérisé tous les clones.
- la bande P5 proteic a la fréquence moins de de 87% être nonhomogeneous en ce qui concerne l'intensité enzymatique d'activité : très intense dans la Sauvignon-population; milieu dans la clone : Sauvignon – 9 Bl; bas dans la clone : Sauvignon – 62 Dg.; absent dans la clone Sauvignon – 111 St;
- la bande P6 proteic avec la basse activité peroxydasic et la fréquence seulement de 47% a caractérisé seulement les clones : Sauvignon – 9 Bl 1 et Sauvignon – population ;
- la bande P7 proteic avec l'intensité enzymatique très basse et la fréquence (réduite) de 40% a caractérisé la clone: Sauvignon – 9 Bl.

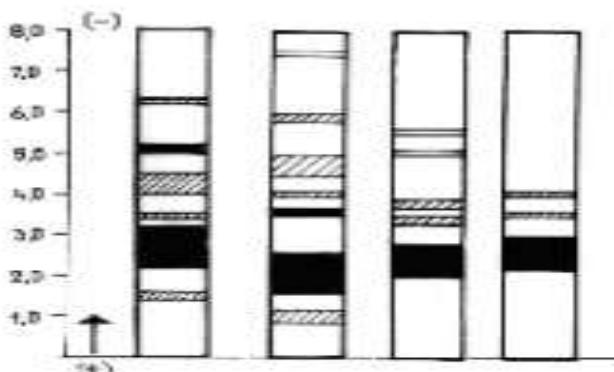


Interprétation de Zymogram (fig. 2) que le nombre variable de bandes isoenzymatic peroxidasic dans les clones étudiés est déterminé par la nature hozygotique ou heterozygotique du locus des gènes synthétisant les enzymes.

L'interprétation de Zymogram donne les résultats suivants :

- la clone Sauvignon-9 Bl est caractérisé par un spectre isoenzymatic très complexe, avec 7 bandes proteic d'activité isoenzymatic intense et moyenne ;
- la population de Sauvignon démontrent un type très semblable de zymogram avec Sauvignon – 62 Dg, avec 5-6 bandes proteic et activité enzymatique intense ou moyenne;

- la clone de Sauvignon – 111 St exposition un polymorphisme isoenzymatic différent. Les bandes P2, P3 et P4 proteic sont les seules bandes communes.



**Fig. 2 - Zymograms caractéristiques des clones étudiés**

## CONCLUSIONS

➤ Dans les clones roumain de Sauvignon montre que les genotypes ont étudié les enzymes peroxidasic peut impliquer le loccus trois du gène la synthèse, puisque 3 bandes au minimum proteic avec l'activité isoenzymatic ont été démontrés. Le nombre maximum des bandes proteic 7 et lui peut être le résultat du caractère homozygotic ou heterozygotic du loccus trois du gène.

➤ La clone Sauvignon – 111 St est caractérisé par un éventail isoenzymatic seulement 3 bandes proteic (P2, P3, P4), qui certifie l'absence de heterozigoty.

➤ Tous les clones ont le differittement zymogrames ceux qui montre le polimorphism genetique et phenotipique de population de cepage Sauvignon blanc.

## RÉFÉRENCES

1. Benin M., Gasquez J., Mahafoudi M., Besis R., 1988 – *Caracterisation biochimique des cépages de Vitis vinifera L. par électrophorèse foliaire. Essai de classification des variétés.* Rev. Vitis, no. 27, pp. 157-172.
2. Boursiquot J.M., Parra P., 1996 – *Contribution à l'utilisation des isoenzymes pour l'identification des portegreffes et des cépages.* Rev. Vitic., Enol., no. 1, pp. 41-49.
3. Buciumeanu Elena, Popescu Florentina, 1998 – *Spectrul izoenzimatic al peroxidazei la viajă de vie regenerată din cultura de antere.* An. I.C.V.V. vol. XV, pp. 11-17.
4. Eiras Dias J.E., Breno Sansa R., 1998 – *Isoenzymatic polymorphism differentiation of Portuguese grapevine cultivars.* Am. J. Enol. and Vitic., no. 1, pp. 86-90.
5. Subden R.E., Krizus A., Logheed S.C., Carey K., 1987 – *Isozyme characterization of Vitis species and some cultivars.* Am. J. Enol. and Vitic., vol. 38, pp. 176-181.
6. Târdea C., Liliana Rotaru, 2001 – *Isoenzymatic investigation of Peroxydase in Romanian Grapevine (Vitis vinifera L.) cultivars.* Revista Cercetări Agronomice în Moldova vol. 3-4 (118)/2001, p. 125-131, Iași.