

IDENTIFICATION VARIETALE DE L'ORGE ET DU MALT

A. MONTEBAULT, J.C. AUTRAN, P. JOUDRIER, M. MOLL\*

Laboratoire de Technologie des Céréales INRA  
9 place Viala - 34060 MONTPELLIER CEDEX (FRANCE)

\* Laboratoire TEPRAL, 2 rue G. Bour  
54250 CHAMPIGNEULLES (FRANCE)

Face à l'influence décisive de la variété sur la valeur brassicole d'une orge, les malteurs et les brasseurs souhaitent pouvoir déterminer la pureté variétale des lots d'orges et de malts qu'ils utilisent.

Sans écarter les méthodes fondées sur les caractéristiques morphologiques du grain qui peuvent servir à un tri préalable des échantillons, les diagrammes électrophorétiques de certaines protéines ou enzymes du grain, qui constituent des marqueurs génétiques spécifiques, paraissent mieux adaptés pour résoudre le problème des malteurs et des brasseurs.

Plusieurs systèmes ont été jusqu'ici explorés : électrophorèse en gel d'amidon, électrophorèse en gel de polyacrylamide, isoélectrofocalisation. Tous les auteurs se sont cependant heurtés à différents problèmes : forte consanguinité des variétés d'orge conduisant à des diagrammes très voisins, pouvoir résolutif insuffisant de la méthode, coût élevé, diagramme différent entre l'orge et le malt correspondant.

Pour toutes ces raisons, nous proposons un système électrophorétique amélioré, applicable indifféremment aux orges et aux malts et permettant de mieux discriminer les variétés les plus cultivées, grâce à une meilleure résolution des fractions hordéines et glutelines et en ayant recours éventuellement à des systèmes enzymatiques pour différencier notamment les cultivars très apparentés.

De plus, devant le délicat problème de l'interprétation des électrophorégrammes, ce qui nécessite une bonne connaissance préalable de ceux-ci, nous avons mis au point un système permettant la lecture des diagrammes et le traitement des données obtenues à l'aide d'un microordinateur.

En ce qui concerne le matériel végétal, 77 cultivars d'orge (semences certifiées) ont été analysés (tableau 1) ainsi que 30 malts (obtenus par micro-maltage par le laboratoire TEPRAL) et 10 malts industriels correspondant aux cultivars retenus.

En ce qui concerne les méthodes, voici les conditions opératoires qui ont été utilisées :

- L'extraction des protéines est réalisée à partir de grain d'orge ou d'orge maltée par les solutions suivantes (8  $\mu$ l de solution/mg de grain) (tableau 2)

- Le fractionnement électrophorétique est réalisé en gels de polyacrylamide-SDS verticaux (appareil LKB). La composition des gels est la suivante (tableau 3).

- La migration a lieu pendant 16 h à 18°C sous intensité constante (3,5 mA/gel).

Les protéines sont ensuite fixées 30 mn dans l'acide trichloracétique 15% (P/V) puis colorées pendant 30 mn à 90°C dans une solution à 0,175% de Bleu de Coomassie BBR 250.

En ce qui concerne les enzymes, les peroxydases et les estérases ont été retenues comme systèmes complémentaires d'identification (notamment pour la différenciation des cultivars très apparentés).

Le même système électrophorétique (extraction + fractionnement) est utilisé pour ces deux enzymes. Le protocole d'utilisation est donné dans le tableau 4 suivant.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Nous nous sommes assurés tout d'abord que pour une variété donnée les électrophorégrammes restaient constants qualitativement quel que soit le milieu (lieu, climat, conditions de culture).

Les diagrammes protéiques peuvent être divisés en 4 zones distinctes A, B, C et D par analogie avec les travaux d'autres auteurs : il est possible d'assimiler la zone A aux albumines, aux globulines et aux hordéines de faible poids moléculaire, les zones B et C correspondent aux hordéines (contrôlées par les gènes hor 2 et hor 1 respectivement). Quant à la zone D, qui n'est pas systématiquement observée chez les autres auteurs, il s'agit probablement de glutélines que le système particulier de réduction et de coloration permet ici de mettre en évidence.

A l'exception de la zone A, les autres zones du diagramme présentent un important polymorphisme qualitatif intervariétal.

Ainsi, l'examen des 77 cultivars d'orge a permis de les classer en 13 types à partir de la zone B, 13 types à partir de la zone C et 4 types à partir de la zone D.

Si l'on prend en compte simultanément ces 3 zones B, C et D : 22 cultivars (29%) peuvent être caractérisés individuellement et parmi ceux-ci on trouve les plus cultivés en France ainsi que ceux recommandés par la Chambre Syndicale de la Malterie Française (Sonja, Alpha, Astrix, Menuet, Bérénice et Nympe). Ces résultats n'illustrent d'ailleurs que les possibilités minimales d'identification car il n'est fait état que des différences qualitatives des diagrammes.

Les autres cultivars se classent en groupe de 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 cultivars mais il est important de souligner que tous ces groupes sont constitués de cultivars très apparentés génétiquement (exemple : Igri, Viva, Pepita).

En ayant recours à 2 critères morphologiques stables et discrets tels que la pilosité de la baguette (Poils larges et droits ou Poils courts et frisés) et la pilosité du sillon (glabre ou velu) il est possible d'identifier 45 % des cultivars.

Enfin, et lorsque cela est nécessaire, si nous utilisons l'électrophorèse des peroxydases et des estérases, enzymes pour lesquelles il est possible de classer les cultivars en 5 types peroxydasiques et 4 types esterases il est possible d'identifier plus de 75 % des cultivars de manière univoque.

L'examen des malts semble présenter a priori des difficultés supplémentaires puisque la germination conduit à une diminution de 40% de la teneur en hor-déine et que le touraillage provoque une insolubilisation des protéines.

Ces problèmes ont été surmontés par l'utilisation d'une solution d'extraction plus drastique (par augmentation de la concentration en réducteur -  $\beta$  Mercaptoéthanol - et en agent dissociant - diméthylformamide).

Les protéines sont alors extraites ou resolubilisées sans difficulté et de façon reproductible à partir d'un malt, ce qui permet, pour la première fois d'obtenir des diagrammes de malts et d'orges correspondants identiques et d'égale qualité.

D'une manière similaire les zymogrammes peroxydasiques et estérasiques des malts ne sont pas modifiés qualitativement. C'est pourquoi l'existence d'un diagramme identique pour l'orge et le malt correspondant a permis l'établissement d'une classification unique d'identification variétale.

Classiquement, l'interprétation des électrophorégrammes repose sur l'identification des différents constituants qui le composent et ceci par deux critères essentiels : la mobilité et la concentration relative de chaque constituant. L'établissement d'une clé de détermination basée sur ces deux critères nécessite donc une parfaite connaissance des diagrammes; de plus, l'introduction annuelle au Catalogue Officiel des Plantes Cultivées de nouveaux cultivars a pour conséquence la refonte partielle, parfois totale, de cette clé.

Devant ces inconvénients et également l'obligation d'avoir recours à du personnel très qualifié pour interpréter ces électrophorégrammes, nous avons pensé que l'automatisation maximum de cette étape délicate était souhaitable.

Pour ce faire nous avons eu recours à une table de digitalisation couplée à un microordinateur.

Sans rentrer dans les détails techniques, disons simplement que cette table permet de calculer (entre autre) des distances automatiquement.

La procédure est alors la suivante :

- A partir d'un électrophorégramme (gel ou photo) une origine est définie (elle peut correspondre à une bande donnée ou à l'endroit du dépôt).

- Puis à l'aide d'un stylo magnétique (relié à la table) chaque constituant du diagramme est pointé successivement.

La mobilité (relative ou absolue) de chaque constituant est enregistrée puis apparaît sur un écran. A partir de ces données, divers traitements peuvent être effectués grâce au microcomputer .

En ce qui nous concerne, nous nous sommes intéressés :

- 1) au nombre de constituants du diagramme protéique,
- 2) à leur mobilité absolue,
- 3) à leur concentration relative (appréciée visuellement par des notes : 1, 3 ou 5)

Les valeurs que nous obtenons et qui définissent chaque cultivar sont les suivantes :

- nombre de constituants = n
- somme des mobilités (M) des n constituants =  $\sum M$
- somme des mobilités (M) des n constituants affectés de leur coefficient de concentration (k) respectif =  $\sum kM$

Grâce à un programme de comparaison, il est alors possible de savoir, à partir de mesures réalisées sur un cultivar inconnu, si les valeurs obtenues correspondent à celles d'un cultivar dont les valeurs sont enregistrées dans un fichier préalablement établi. En cas d'identité, le nom du (ou des) cultivar(s) reconnu(s) apparaît(ssent) sur l'écran et/ou sur l'imprimante.

Ce système présente donc les avantages suivants :

- Mesures simples à effectuer,
- Maniement du microordinateur rapidement assimilé (grâce à un dialogue interactif avec l'utilisateur).
- Excellente reproductibilité des mesures
- Ne nécessite pas une remise en cause d'une clé de détermination. Tout nouveau cultivar est rentré dans le fichier par ses valeurs propres.

Nous croyons donc pouvoir répondre de façon efficace au problème délicat de l'interprétation des électrophorégrammes tout au moins en ce qui concerne l'orge. Mais il est vraisemblable que cette méthode, moyennant une adaptation spécifique, pourra s'appliquer à l'identification variétale d'autres céréales (au blé en particulier).

TABLEAU 1

LISTE DES CULTIVARS D'ORGE

ET DES MICROMALTS OU MALTS INDUSTRIELS(\*) ANALYSES

ADORRA	3	CORNEL	2 *	IRIS	1	PIRATE	6 *
AGER	6	CYTRIS	10	JULIA	8	PIROLINE	5
ALPHA	6 *	DARLING	10	KATJA	8	PLAISANT	8 *
ANTARES	6	DEISTER	1 *	KORU	1	POLKA	2
ARAMIR	2 *	DRAGON	4	KYM	1	PORTHOS	2 *
ASSE	8	DRAM	3	MAISONNE	2	RIKA	6
ASTRIX	8 *	ELSA	6	MALTA	8	ROBUR	6 *
ATHOS	2 *	ERNA	2	MARION	6	ROXANE	2
AUREA	1	ESTELLE	6 *	MAZURKA	7	SONJA	8
BARBE ROUSSE	13 *	FANNETTE	5	MENUET	1	SYMPA	8 *
BEATRICE	7 *	GEORGIE	1 *	MIKADO	8 *	THIBAUD	7 *
BEKA	9	GERBEL	6 *	MOGADOR	6 *	TRIUMPH	3
BERAC	7 *	GOLDSPEAR	12 *	MONARQUE	8	VIVA	8 *
BERENICE	7	HATIF GRIGNON	13	MULTUM	1	VOGUE	9 *
BETINA	1 *	HAVILA	1	NICOLE	2	VOLLA	9
CARINA	4 *	HOP	13	NUDINKA	2	WELAM	10
CERES	6 *	HYPOLY	11	NYMPHE	8 *	YRIBA	2
CERISE	1	IGRI	8 *	OMBELLE	1		
CLARET	3	INGRID	7	PATTY	2 *		
CORALLE	2	IRANIA	2 *	PEPITE	8		

(\*) analyse de variétés en micromalt ou malt industriel.

TABLEAU 2

## EXTRACTION DES PROTEINES DE L'ORGE OU DU MALT

Solution stock :		ORGE	MALT
- Tampon TRIS 1M pH 6.8	= 6,25 ml		
- Dodécylsulfate de sodium	= 2g		
- Glycérol	=10 ml		
- Pyronine	=10 mg		
- Eau q.s.p	=28,30 ml	3,40 ml	3,40 ml
$\beta$ Mercaptoéthanol		0,95 ml	1,20 ml
Diméthylformamide		1,80 ml	2,00 ml
Eau q.s.p.		12,00 ml	12,00 ml

Solution utilisées pour extraire les protéines du grain d'orge ou du grain de malt.

- 2 à 3 h à température ambiante
- puis 2 mn30 à 100°C
- Centrifugation 15 mn à 3 500 t/mn
- dépôt : 10  $\mu$ l de surnageant

TABLEAU 3

COMPOSITION DES GELS DE POLYACRYLAMIDE - SDS

- Gel de concentration :

Solution B (= 0,6 g Acrylamide + 8,66 mg Méthylène bis-acrylamide/ 100 ml)	16,8 ml
Tampon Tris IM pH 6,8	2,5 ml
Persulfate d'ammonium 1 %	0,75 ml
SDS 10 %	0,2 ml
Temed	15 µl

- Gel de séparation :

Solution A ( 22,6 g Acrylamide + 0,186 g Méthylène bisacrylamide / 100 ml)	46 ml
Tampon Tris IM pH 8,8	30 ml
Persulfate d'ammonium 1 %	2 ml
SDS 10%	0,8 ml
Temed	40 µl

- Tampon pour les bacs : Tris/glycine/SDS pH 8,4

Tris	30 g	} 1 litre
Glycine	141,1 g	
SDS	10 g	

Solution à diluer 10 fois avant utilisation.

