

**POLYMORPHISME DE TREIZE ZYMOGRAMMES OBSERVÉS  
PARMI DIVERSES ESPÈCES SAUVAGES ET CULTIVÉES  
DU GENRE *ORYZA***

**par**

**G. SECOND et P. TROUSLOT**

### Summary

The polymorphism of thirteen zymograms among various wild and cultivated species of rice (genus *Oryza* - mainly genome AA) is studied.

More than 2130 strains representing 660 populations were in total utilized. The observed zymograms are diagrammatically shown for each species with the order of magnitude of their relative frequencies. Genetic interpretation of the zymograms is attempted. It is based on the comparison of all observed zymograms with reference to the reproductive system (self compatible or incompatible) of the species considered. For 12 loci, mendelian analysis has confirmed the proposed hypothesis. The presumed total number of polymorphic loci is 40.

A study of the heat stability of the isozymes shows heterogeneity of some allelic classes (electromorphs), particularly at the interspecific level.

Enzyme polymorphism has proved to be a good descriptor for the study of the variability of the genus *Oryza*, the phylogenetic relationship between species and the history of rice domestication. Moreover it gives numerous genetic markers for others studies.

### Résumé

Le polymorphisme de treize zymogrammes est étudié parmi les espèces sauvages et cultivées de riz (genre *Oryza* - génome AA principalement). Plus de 2130 lignées représentant 660 populations ont au total été utilisées. Les zymogrammes observés sont présentés diagrammatiquement par espèce avec l'ordre de grandeur de leurs fréquences relatives. Une interprétation génétique des zymogrammes est tentée qui est basée sur la comparaison des zymogrammes observés en fonction du mode de reproduction, autogame ou allogame, des espèces considérés. Pour 12 loci, l'analyse mendélienne a confirmé les hypothèses proposées. Le nombre total de loci polymorphes présumés est de 40.

Une étude de la thermosensibilité des isozymes séparés montre une hétérogénéité de certaines classes alléliques (électromorphes), particulièrement au niveau interspécifique.

Le polymorphisme enzymatique est un descripteur puissant pour l'étude de la variabilité du genre *Oryza*, des relations phyto-génétiques entre espèces et de l'histoire de la domestication des riz. Il fournit en outre de nombreux marqueurs génétiques pour d'autres études.

## INTRODUCTION

Le polymorphisme enzymatique est un aspect particulièrement intéressant de la variabilité phénotypique. Directement représentatif de systèmes géniques simples, il est un reflet de la variabilité génétique.

Une vingtaine d'espèces diploïdes et tétraploïdes constituent le genre *Oryza*. Les espèces sauvages sont distribuées dans la zone inter-tropicale du globe.

Six génomes diploïdes, au moins, ont été caractérisés. Les espèces cultivées et les espèces sauvages les plus apparentées sont toutes diploïdes et forment le groupe "*sativa*" (génome AA) distribué en Afrique, Amérique, Asie et Océanie.

En Afrique, deux espèces sauvages, distinguées sans ambiguïté dans tous les cas, représentent le groupe *sativa*. Ce sont : *O. breviligulata* A. Chev. et Roehr (syn. *barthii*, espèce annuelle autogame et *O. longistaminata* A. Chev. et Roehr (syn. *O. perennis* subsp. *barthii* ou *O. barthii*), espèce pérenne allogame et à multiplication végétative par rhizome. (Le nom *O. barthii* A. Chev. ayant été utilisé pour désigner l'une ou l'autre des deux espèces sauvages africaines, il est préférable de l'écartier).

En Asie, ce groupe est représenté par un continuum de formes annuelles et pérennes rassemblées dans l'espèce *O. perennis* Moench "forme asiatique" (syn. *rufipogon* Griff, pérenne et *O. nivara* Sharma et Shastry, annuelle).

En Amérique, un continuum de formes est également rencontré qui se subdivise en un groupe "Amérique Centrale" (syn. *O. cubensis*) et un groupe "Amérique du Sud" (MORISHIMA, 1969). L'ensemble peut être regroupé sous l'appellation *O. perennis* "forme américaine".

En Océanie se rencontre une forme "océanienne" d'*O. perennis*, annuelle et autogame et une forme se rattachant au rameau asiatique d'*O. perennis* sur la base des tests de fertilité des hybrides F1.

Deux espèces cultivées sont distinguées : *O. sativa* L., domestiquée en Asie à partir d'*O. perennis* Asiatique et *O. glaberrima* Steud. domestiquée en Afrique à partir d'*O. breviligulata*, comme les résultats de l'analyse des zymogrammes le confirment.

L'étude systématique du polymorphisme enzymatique de ce groupe végétal qui est un des mieux représenté dans les collections mondiales de ressources génétiques doit permettre de :

- 1) mieux connaître les relations phylogénétiques dans le groupe et les introgressions spontanées de gènes entre espèces,
- 2) évaluer les ressources de variabilité de chaque espèce,
- 3) fournir des marqueurs génétiques pour des études de physiologie ou de génétique du riz.

L'étude du polymorphisme des espèces du genre *Oryza* en électrophorèse d'isozymes a déjà été reportée il y a plus de 10 ans dans les zymogrammes d'estérases, peroxydases et phosphatases acides seulement (SHAHI, MORISHIMA et OKA, 1969). Il fut montré : 1) la variabilité intraspécifique diffère sensiblement selon les espèces, les formes cultivées ne présentant aucun zymogramme particulier par rapport aux espèces sauvages ancestrales respectives.

2) les espèces pérennes ont tendance à accumuler une variabilité énorme dans leurs populations,

3) les différentes espèces et les types *indica* et *japonica* d'*O. sativa* peuvent être caractérisés par la fréquence de certains électromorphes ou de leurs associations mais, dans son ensemble, la variabilité mise en évidence représente un continuum entre espèces.

Plus récemment, NAKAGAHRA, AKIHAMA et HAYASHI (1975) ont mis en évidence, parmi 776 cultivars traditionnels asiatiques d'*O. sativa*, l'existence d'un cline géographique dans la fréquence d'électromorphes d'estérases.

Parallèlement à la participation à un programme de collection des ressources génétiques du riz en Afrique (variétés traditionnelles cultivées et espèces sauvages), la mise au point d'une autre méthode d'électrophorèse d'enzymes appliquée au riz a été effectuée au Laboratoire de Génétique de l'ORSTOM à Abidjan depuis 1974-1975.

Selon la base génétique du matériel analysé (variétés cultivées, écotypes, espèces ancestrales des riz cultivés ou espèces du genre *Oryza*), l'intérêt de chaque enzyme pour la mise en évidence d'un polymorphisme génétiquement interprétable n'est pas le même : certaines sont monomorphes dans une espèce donnée, d'autres ont un polymorphisme tel que la "parentée" entre bandes d'électrophorèse présentées par des espèces éloignées est difficile à établir (cas des estérases et des peroxydases par exemple) La présentation des principaux zymogrammes observés permet la visualisation du polymorphisme de chacune des enzymes étudiées.

Treize zymogrammes sont étudiés : Alcool deshydrogénase (ADH), Glutamate deshydrogénase (GDH), Malate deshydrogénase (MDH), Isocitrate deshydrogénase (ICD), 6 Phosphogluconate deshydrogénase (PGD), Catalase (CAT), Peroxydase (POX), Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), Phosphoglucomutase (PGM), Estérase (EST), Phosphatase acide (PAC), Leucine Aminopeptidase (LAP), Phosphoglucoseisomérase (PGI).

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 1°) COLLECTION DE PLANTES UTILISEES

Le matériel d'étude se compose de plus de 2.130 lignées appartenant à 660 populations. Les espèces africaines sont représentées par des plantes issues de graines prélevées directement dans les rizières ou les populations naturelles lors des prospections. Pour les autres espèces, une collection de lignées a été constituée avec les origines suivantes :

- Collection du National Institute of Genetics (Japon) : 18 lignées d'*O. perennis* (Asie, Amérique et Océanie), 20 lignées intermédiaires entre *O. sativa* et *O. perennis* (en provenance du "Jeypore tract" en Inde) et 4 variétés d'*O. sativa*.
- Collection de l'IRRI (Philippines) : 40 lignées représentant les différentes espèces du genre *Oryza* (à l'exception d'*O. meyeriana* et *O. schlechteri*).
- Collection de l'IRAT en Côte d'Ivoire : 117 variétés d'*O. sativa* choisies pour leurs origines diverses et représentant les écotypes *indica*, *javanica* et *japonica* de l'espèce.
- Collection de l'INRA en France : 25 variétés d'*O. sativa* de type *japonica* adapté aux pays tempérés.
- Collection du National Institute of Agricultural Sciences (Japon) : 18 variétés d'*O. sativa* d'origine très diverses et représentant les principaux écotypes de l'espèce ainsi que la variabilité mise en évidence au niveau de 3 loci "estérases" dans 1.095 cultivars traditionnels (NAKAGAHRA, 1977).

### 2°) CULTURE DES PLANTES

La dormance des semences peut être levée par différentes méthodes selon qu'elle est plus ou moins prononcée (variété ou espèce considérée, âge et conditions de conservation des graines) et selon que l'on recherche une germination immédiate ou non. Le décorticage des graines, l'ablation d'une portion (1/3 à 3/4) de l'albumen et/ou un séjour prolongé (quelques jours à 1 mois) à une température sèche de 50°C sont utilisés.

Les graines sont mises à germer après désinfection dans une solution de chlorure mercurique à 2% pendant 5 mn.

Pour leur numérotation individuelle, elles sont collées sur un papier buvard pour être placées dans une boîte de Pétri ou mises en terrine (terre stérilisée à la chaleur humide) selon un quadrillage de 10 lignes et 10 colonnes. Les plantules sont ensuite repiquées en pots de 1 l de terre immergés dans une solution nutritive (N, P, K, Ca, Mg ---).

Les traitements insecticides sont proscrits avant l'analyse des estérases.

### 3°) CHOIX DE L'ORGANE

a) Les jeunes organes prélevés sur des graines en germination (coléoptiles, première feuille, racines séminales ...) donnent pour certaines enzymes (MDH, PGI, en particulier) des zymogrammes avec des bandes très fines. La quantité d'organe disponible à ce stade sans sacrifier la plante est cependant minime et ne permet pas la révélation de nombreux enzymes. Les stades fugaces de la germination ne permettent d'autre part pas d'analyser de manière répétable des enzymes variables en fonction de l'ontogénèse telles que les estérases et les peroxydases.

Les organes de la fleur, où le pollen, présentent l'inconvénient d'être d'apparition tardive et hétérogène selon le cycle des plantes. Certaines espèces sauvages fleurissent d'autre part très irrégulièrement.

En définitive, des extraits de feuilles prélevées sur des plantes âgées de trois semaines au moins sont généralement utilisées.

#### b) Choix des feuilles

Des essais ont montré que les résultats diffèrent sensiblement selon le stade et la partie de la feuille prélevée et en deuxième lieu selon le stade de la plante échantillonnée. Nous distinguons principalement :

- Feuille en croissance ( $F_1$ ) : deux portions donnent des résultats très différents : partie verte exsertée et partie blanche non exsertée qu'il faut extraire par traction vers le haut.
- Feuille adulte : on la désigne par son rang à partir du sommet de la talle : 2ème feuille =  $F_2$ , 3ème feuille =  $F_3$ ... la feuille paniculaire ( $F_p$ ) est la dernière feuille qui apparaît sur une talle avant la floraison. On distingue principalement le limbe et la gaine qui peuvent avoir une expression de gènes différentes (voir en particulier pour les peroxydases et les Phosphatases acides : PAI, ENDO and OKA, 1973 et 1975), ou donner des zymogrammes plus ou moins stables (MDH, GOT en particulier).

4 stades principaux de la plante sont échantillonnés :

germination, entre le repiquage et le stade du tallage (jeune plantule),

stade du tallage,

stade de la floraison.

### 4°) ELECTROPHORÈSE

La technique utilisée est décrite et les photographies des plaques révélées sont présentées dans l'article précédent (TROUSLOT et SECOND, 1980).

5°) SUCCESION CHRONOLOGIQUE DE L'ELECTROPHORESE DE DIFFERENTES ENZYMES AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA PLANTE

Les conditions optimales d'électrophorèse ayant été définies pour chaque enzyme : stade de l'organe échantillonné, pH de la migration et épaisseur du papier d'insertion de l'extrait (Réf. citée ci-dessus Tableau 1), on peut successivement associer l'analyse de plusieurs enzymes au cours de la croissance des plantes, comme suit :

- Sur les organes de la germination l'analyse des PGI est effectuée avec avantage pour l'espèce *O. longistaminata* : la finesse des bandes permet de distinguer plus facilement les figures d'hétérozygotes.
- Sur la partie verte d'une feuille  $F_1$  d'une très jeune plante (2 à 3 feuilles après le repiquage) on peut révéler EST et POX : pH 6,0 et papier Watman (W) n° 3. A ce stade, la partie blanche de la même feuille permet de révéler la bande d'estérases "F<sub>1</sub>" avec *O. breviligulata*. On peut aussi utiliser en mélange des deux parties de la feuille.
- Au stade du tallage de la plante, nous révélons sur la partie verte d'une autre feuille  $F_1$  :
 

MDH et GOT	: pH 6,0	-	W N°1
LAP et PGM	: pH 6,0	-	W N°1
GDH et PGD	: pH 8,0	-	W N°1

Sur la partie cathodique du gel on peut aussi révéler les peroxydases cathodiques aux deux pH.

Avec l'espèce *O. longistaminata*, il est préférable d'utiliser une gaine de feuille adulte ou la partie blanche d'une feuille  $F_1$  pour révéler les MDH et GOT pour éviter la distorsion des zymogrammes.

- Sur le limbe de feuilles complètement développées ( $F_2$ - $F_3$ ) on peut révéler :
 

EST - PGI	(2ème révélation)	: pH 6,0	-	W N°3
PGI - PGM		pH 8,0	-	W N°1
GOT - LAP		pH 6,0	-	W N°1
- Pendant toute la durée de la croissance de la plante, on peut révéler sur la partie blanche, extraite, d'une feuille  $F_1$  :
 

ADH - CAT	: pH 8,0	-	W N°1
ICD - PGD	: pH 8,0	-	W N°1
MDH - LAP	: pH 6,0	-	W N°1

- Sur une feuille F<sub>3</sub> ou F<sub>4</sub> et de préférence FP développée on peut révéler :

PAC - POX : pH 8,5 (gel Borate) W - N°1

PGM - PGI : pH 8,0 - W N°1

GOT : pH 6,0 - W N°1

#### 6°) TESTS DE THERMOSENSIBILITE DES ISOZYMES

Ils sont décrits dans l'article cité ci-dessus.

#### 7°) INTERPRETATION GENETIQUE DES ZYMOGRAMMES

Nous entendrons par zymogramme (Z.), la combinaison de bandes observée sur une plaque d'électrophorèse pour un individu avec un système de révélation spécifique d'un enzyme ou d'un groupe d'enzymes non spécifiques.

Les bandes de Z. sont la visualisation d'isozymes dont les origines multiples se classent en 3 grandes catégories (HARRIS and HOPKINSON, 1976) :

- Plusieurs loci de gènes codant pour des chaînes polypeptidiques structurellement différentes de l'enzyme,

- Allèles multiples à un locus déterminant des versions structurellement distinctes d'une chaîne polypeptidique particulière,

- modifications ultérieures à la transcription de la structure enzymatique : isozymes secondaires.

Beaucoup de protéines enzymatiques sont multimériques et peuvent combiner des produits primaires de plusieurs gènes (isozymes hétéromère) ou du même gène (isozyme homomère) formant des figures de Z. bien connues (même réf.).

Des gènes distincts peuvent donner des protéines enzymatiques indistinguables par électrophorèse ou non distinguées avec une technique donnée. KING et OHTA (1975) appellent "électromorphe" une classe d'allèles caractérisée par un phénotype commun en électrophorèse.

Dans la présentation des Z. qui suit, la nomenclature des bandes est effectuée sur la base d'une interprétation génétique généralement basée sur la comparaison de tous les Z. observés et parfois complétée par une analyse mendélienne sur la descendance de croisements.

Une interprétation génétique des Z. est largement facilitée par l'existence, dans le complexe spécifique étudié, d'espèces autogames généralement homozygotes (*O. breviligulata*, espèces cultivées, certains *O. perennis* etc...) et d'espèces allogames fréquemment hétérozygotes (*O. longistaminata*) dont la structure génétique de certaines populations est panmictique.

En fonction des différentes origines possibles (présentées ci-dessus) des isozymes, on formule l'hypothèse la plus simple de déterminisme génétique compatible avec les situations observées. Les principes suivants sont appliqués :

a) les bandes d'électrophorèse sont généralement codées par des allèles codominants : l'additivité de la plupart des bandes observées a été vérifiée par analyse d'hybrides F1 intra ou interspécifiques, principalement avec les espèces cultivées et *O. breviligulata* : dans tous les cas, toutes les bandes parentales sont présentes avec, parfois, des bandes hybrides supplémentaires et des intensités de coloration diminuées pour les bandes apportées par un seul des parents.

b) L'absence de bande à une position donnée -ou une coloration très faible- est généralement récessive par rapport à une coloration intense. Ceci a été vérifié pour les estérases, leucine aminopeptidases et phosphatases acides au niveau d'hybrides F1, dans plusieurs croisements différents pour chaque bande. Un exemple de gène "régulateur" se comportant comme dominant a cependant été rapporté avec les peroxydases chez *O. perennis* (SHAHI, CHU et OKA, 1969) et doit attirer l'attention sur cette possibilité.

c) Un électromorphe peut coder plusieurs bandes d'électrophorèse : dans ce cas, les bandes sont voisines et systématiquement associées dans leur mobilité (Rf). Il peut s'agir d'isozymes secondaires ou d'artefacts éventuellement modifiés par le génotype ou les conditions de révélation.

d) Les bandes hybrides hétéromères sont *grosso modo* régulièrement réparties entre les bandes homomères qui sont seules prises en compte dans l'interprétation génétique. Le nombre des bandes hybrides est fonction de la structure quaternaire de l'enzyme (1 chez les enzymes dimères, 5 chez les hexamères, etc...).

e) Les bandes dont la présence n'est pas systématiquement répétable ne sont pas prise en compte.

Dans tous les cas où l'analyse mendélienne est effectuée, elle est pour l'instant en accord avec l'interprétation proposée : 12 loci ont été étudiés au total qui se décomposent comme suit : 3 loci EST (NAKAGAHRA, 1977), 3 loci PAC (PAI, ENDO et OKA, 1975) et 6 loci divers (Données non publiées des auteurs).

Les populations allogames permettent d'autre part de tester la validité des hypothèses génétiques retenues par la conformité des répartitions génotypiques observées avec la loi de HARDY-WEINBERG. Deux populations d'*O. longistaminata* ont ainsi été étudiées pour 5 loci : 1 population du delta central du Niger au Mali (LL) et 1 population de Tamatave à Madagascar (AL) (Tableau 1).

Les génotypes observés sont dénombrés au vu des zymogrammes sur la base de l'interprétation génétique proposée et les fréquences des électromorphes sont calculées.

1-1 : Locus Glutamate déshydrogénase "A"

Population		Phénotype (P) et Genotype (G)			Fréquence des types alléliques			
n	P	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	χ <sup>2</sup>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	
	G	A <sub>1</sub> /A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>				
LL	101	obs.	77	2	22	0,17 N.S.	. 87	. 13
		att.	76,6	1,7	22,6			
AL	41	obs.	41	0	0	-	1	0
		att.	41	0	0			

1-2 : Locus Malate déshydrogénase "B"

Population		Phénotype (P) et Génotype (G)			Fréquence des types alléliques			
n	P	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub>	χ <sup>2</sup>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	
	G	B <sub>1</sub> /B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> /B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub>				
LL	84	obs.	49	6	29	0,33 N.S.	. 75	. 24
		att.	47,8	5,1	31,1			
AL	55	obs.	14	15	26	0,16 N.S.	. 49	. 51
		att.	13,2	14,3	27,5			

1-3 : Locus Malate déshydrogénase "C"

Population		Phénotype (P) et Génotype (G)			Fréquence des types alléliques			
n	P	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub> /C <sub>2</sub>	χ <sup>2</sup>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	
	G	C <sub>1</sub> /C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> /C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub> /C <sub>2</sub>				
LL	85	obs.	73	2	10	0,3 N.S.	. 92	. 08
		att.	71,4	0,6	12,9			
AL	55	obs.	17	12	26	0,12 N.S.	. 54	. 46
		att.	16,3	11,4	27,3			

1-4 : Locus - Estérase "E"

Population		Phénotype (P) et Génotype (G)				Fréquence des types alléliques				
	n	P	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>4</sub> /E <sub>5</sub>	χ <sup>2</sup>	E <sup>-</sup>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	
		G	E <sup>-</sup> /E <sup>-</sup>	E <sub>4</sub> /-	E <sub>5</sub> /-	E <sub>4</sub> /E <sub>5</sub>				
LL	205	obs.	7	159	10	29	0,41 N.S.	.19	.71	.10
		att.	7,3	158,4	9,8	29,1				
AL	51	obs.	0	51	0	0	-	-	1	0

1-5 : Locus - Leucine amino-peptidases "E"

Population		Phénotype (P) et Génotype (G)						Fréquences des types alléliques				
	n	P	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>	E <sub>4</sub> /E <sub>5</sub>	E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub>	E <sub>5</sub> /E <sub>6</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>	
		G	E <sub>4</sub> /E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub> /E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub> /E <sub>6</sub>	E <sub>4</sub> /E <sub>5</sub>	E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub>	E <sub>5</sub> /E <sub>6</sub>				
LL	95	obs.	37	6	6	17	21	8,0	3,9 N.S.	.59	.19	.22
			33,0	3,6	4,5	21,6	24,1	8,0				
AL	50	obs.	42	1	0	7	0	0	0,05 N.S.	.91	.09	-
		att.	41,4	0,4	0	8,2	0	0				

TABLEAU 1 : COMPARAISON DES REPARTITIONS GENOTYPIQUES OBSERVEES ET ATTENDUES DANS L'HYPOTHESE DE LA PANMIXIE POUR CINQ LOCI PARMIS DEUX POPULATIONS D'*O. LONGISTAMINATA*.

Légende : P : Phénotypes des bandes homomères  
n : Nombre d'individus étudiés  
obs. : Répartition observée  
att. : Répartition attendue

(Dans le cas d'un "électromorphe muet", sa fréquence est calculée par la racine carrée de la fréquence de l'homozygote récessif).

Le nombre attendu de génotypes est calculé par application de la loi de HARDY-WEINBERG sur les fréquences d'électromorphes, et les nombres attendus et observés sont comparés par le test du  $\chi^2$ . (Les classes inférieures à 5 sont regroupées à la classe restant la plus faible).

Par rapport à une nomenclature arbitraire des bandes, cette interprétation permet de ne pas prendre en considération les isozymes secondaires ni les isozymes hétérodimères : elle permet le calcul de distances génétiques basées sur des fréquences d'électromorphes. Elle doit néanmoins être considérée comme provisoire.

Les symboles suivants sont utilisés pour la nomenclature : une lettre majuscule pour chaque locus et un chiffre en indice pour chaque allèle. Dans le cas des génotypes homozygotes seul le génotype haploïde a parfois été écrit.

Le chiffre 0 symbolise "l'électromorphe nul". L'interprétation génétique des Z. est portée en correspondance de leurs diagrammes.

Les fréquences relatives observées pour chaque Z. dans une espèce particulière sont indiquées avec le code suivant :

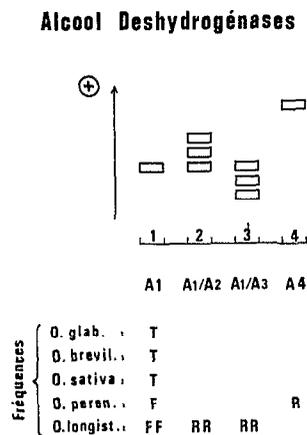
- T : seul Z. observé dans l'espèce
- FF : > 90% des Z. observés dans l'espèce
- F : entre 90% et 10% des Z. observés dans l'espèce
- R : < 10% des Z. observés dans l'espèce
- RR : < 1% des Z. observés dans l'espèce
- X : Z. observé, sans précision de fréquence.

## RÉSULTATS

A) PRESENTATION DES ZYMOGRAMMES (Z.)- ALCOOL DESHYDROGENASE - (ADH) Fig. 1

Révélsés sur des extraits de partie non exertée de feuilles en croissance, les Z. d'ADH présentent typiquement la même bande chez toutes les espèces du groupe *sativa*. Deux Z. à trois bandes voisines ont cependant été rarement observées avec *O. longistaminata*.

Aucun polymorphisme n'a été révélsé dans les espèces cultivées et *O. breviligulata*. Une population d'*O. perennis* océanien (W 1636) présente cependant une bande unique beaucoup plus rapide qui est retrouvée dans les espèces *O. australiensis* et *O. brachyantha*. L'espèce allotétraploïde *O. latifolia* est caractérisée par un Z. hybride avec trois bandes (A<sub>1</sub>/A<sub>4</sub>).



GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH) Fig. 2  
-----

Les 6 Z. observés ont tous 7 bandes équidistantes. Les bandes extrêmes sont symbolisées par A et B, elles sont généralement beaucoup plus colorées que les bandes intermédiaires, particulièrement la bande B, plus rapide.

L'interprétation génétique repose sur l'hypothèse de deux loci homologues A et B dont les produits peuvent s'hybrider.

La structure quaternaire des G.D.H. étant hexamérique, il y a 5 bandes hybrides. 3 positions sont révélées pour chacune des bandes extrêmes ce qui distingue 3 électromorphes à chacun des loci A et B. Les zymogrammes 4 et 5 sont représentatifs d'une hétérozygotie pour les loci A et B, respectivement.

La répartition panmictique des génotypes a été vérifiée pour le locus A dans l'espèce *O. longistaminata* (voir tableau 1-1).

Le tableau 2 présente l'interprétation des zymogrammes 1 et 5 par la polymérisation au hasard du produit des 2 loci A et B avec 1 ou 2 allèles. 7 bandes sont attendues chez les homozygotes et 28 bandes chez les hétérozygotes à l'un des loci. On remarque que la densité de coloration des 7 bandes n'est pas en rapport avec leur proportion relative escomptée dans le cas d'une association aléatoire. La polymérisation entre les produits des deux loci A et B semble donc s'effectuer préférentiellement entre produits du même locus.

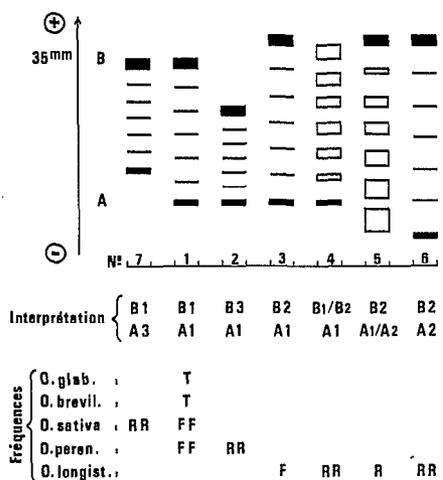
Type d'hexamère :	Nombre de bandes et leur concentration chez l'homozygote A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> (Z. 1)	Nombre de bandes correspondantes chez l'hétérozygote A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> B <sub>2</sub> (Z. 5)
B B B B B B	1 : 1/64	1
B B B B B A	1 : 6/64	2
B B B B A A	1 : 15/64	3
B B B A A A	1 : 20/64	4
B B A A A A	1 : 15/64	5
B A A A A A	1 : 6/64	6
A A A A A A	1 : 1/64	7
		28

TABLEAU 2 : Interprétation des Z. 1 et 5 de G.D.H. par la polymérisation au hasard des polypeptides produits à 2 loci avec 1 ou 2 allèles par locus.

Chez les hétérozygotes, les bandes plus larges que les bandes parentales, et intercalaires, qui apparaissent sont interprétées comme le regroupement des bandes hybrides entre produits alléliques. La coloration de ces bandes larges est plus intense dans la partie médiane : la polymérisation entre les produits de 2 allèles semble, en première approximation, s'effectuer au hasard.

Le Z. 4 a été trouvé chez quelques plantes d'une population d'*O. longistaminata* de Madagascar mais jamais dans les populations d'Afrique sauf rares exceptions d'hybrides "Obakes" (CHU et OKA, 1970) naturels ou contrôlés entre *O. longistaminata* et *O. sativa* ou *O. glaberrima*. Dans la population de Madagascar, échantillonnée près d'une rizière, ce Z. s'explique par une introgression de gènes d'*O. sativa* car les plantes qui le présentent, croisées entre elles donnent une descendance dont certains individus ressemblent à *O. sativa*.

#### ZYMOGRAMMES DE GLUTAMATE-DESHYDROGENASES



## MALATE DESHYDROGENASE (MDH) Fig. 3

Les 27 Z. observés sont portés sur la fig. 3 pour les espèces du groupe *sativa* d'une part et pour les autres espèces les plus fréquentes du genre *Oryza* d'autre part. Chez ces dernières, seules 2 à 3 plantes, ont été analysées par espèce.

L'interprétation génétique fait appel à 3 loci au moins (A, B et C).

Les loci A et B codent le groupe des 3 à 6 bandes les plus lentes. Le cas de l'hybride entre individus présentant les Z. N° 2 et 3 a été étudié dans deux croisements dans l'espèce *O. breviligulata* : il présente le Z. N° 14 à 6 bandes, également rencontré dans certaines populations d'*O. longistaminata*. La génération F2 ségrège entre les types parentaux et hybrides selon le rapport 1-1-2 pour les deux croisements (20, 23 et 38 individus, respectivement et au total).

Le tableau 3 donne l'interprétation des Z. n° 3, 14 et 2 par l'association au hasard du produit de 2 loci avec 1 ou 2 allèles chacun. (Les produits monomères sont symbolisés comme les électromorphes qui les codent). L'intensité de coloration des bandes correspond *grosso modo* à la concentration attendue des différents produits dimères.

Zymogramme	3	14	2
Génotype	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> B <sub>1</sub>
Phénotype (Produits dimères)	B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> 1/4	B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> 1/4	B <sub>1</sub> B <sub>1</sub> 1/4
	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> 1/2	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> 1/4	
		A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> 1/4	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> 1/2
	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> 1/4	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> 1/16	
		A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> 1/8	
		A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> 1/16	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> 1/4

TABLEAU 3 : Interprétation des Z. de M.D.H. à 3 ou 6 bandes n° 3, 14 et 2 par la dimérisation au hasard du produit primaire de 2 loci avec 1 ou 2 allèles par locus - Entre parenthèses : proportion attendue des différents dimères.



4 électromorphes au moins sont distingués au locus A et 3 au locus B dans les espèces du groupe *Sativa*.

Le locus C code le groupe des 2 ou 3 bandes les plus rapides. La bande C apparaît constituée d'une bande majeure associée à une bande mineure (probablement isozyme secondaire) qui disparaît chez les hétérozygotes, peut être par un effet de concentration. 3 électromorphes sont distingués à ce locus dans l'espèce *O. longistaminata*.

La distribution panmictique des génotypes est vérifiée pour les loci B et C dans l'espèce *O. longistaminata* (voir tableau 1-2 et 1-3).

Le cas du Z. N°1 rencontré chez un échantillon, fixé pour ce caractère, d'*O. perennis* (W 120) est particulier. Il présente 3 bandes C comme dans les hétérozygotes C1/C3 (Z. 17) et les Z. d'espèces tétraploïdes (Z. 23 et 24). En l'absence d'expérimentation complémentaire les bandes lentes sont considérées comme des isozymes secondaires.

Parmi le complexe spécifique *Sativa* on remarque que le Z. N°3 est le plus fréquent dans toutes les espèces : c'est le Z. caractéristique du génôme AA qui ne semble pas se retrouver - tout du moins fréquemment - dans les autres espèces du genre *Oryza*. Parmi ces dernières, chaque génôme présente des Z. différents à l'exception de l'espèce *O. australiensis* (génôme E) qui partage le Z. 21 avec *O. officinalis* (génôme C). Ces deux espèces se distinguent cependant par d'autres enzymes (ADH notamment).

Remarquons que le Z. 23 de certains *O. punctata* est hybride entre les Z. 18 (*O. eichingeri*, génôme CC) et 19 (certains *O. punctata* : génôme BB présumé). Ce Z. 23 correspond aux formes tétraploïdes d'*O. punctata* (génôme BBCC). *O. minuta* qui possède également le génôme BBCC présente le même Z. 23 ou une variante : Z. 24.

ISOCITRATE DESHYDROGENASE (ICD) Fig. 4

-----

La même bande dédoublée est régulièrement observée dans toutes les espèces du groupe *Sativa*. Une seule exception a été trouvée dans la variété Sunbonnet d'*O. sativa* qui présente une bande légèrement plus lente.

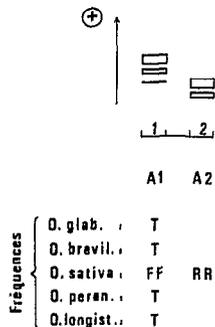
6. PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASE (GPD) Fig. 5

-----

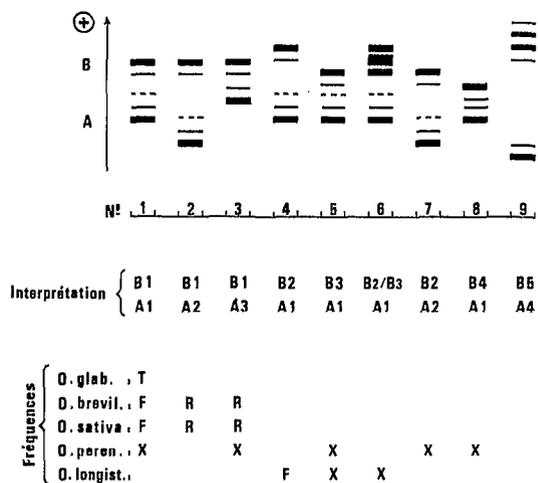
Deux bandes principales extrêmes sont distinguées avec des bandes intercalaires représentant probablement des isozymes secondaires.

9 Z. sont présentés sur la fig. 5 ; *O. longistaminata* (Z. 4) et *O. perennis* océanien (Z. 9) sont caractérisés par des Z. qui leur sont propres mais de nombreuses variantes sont également observées.

**Isocitrate Deshydrogénases**



**ZYMOGRAMMES 6-PHOSPHO-GLUCONATE-DESHYDROGENASES**

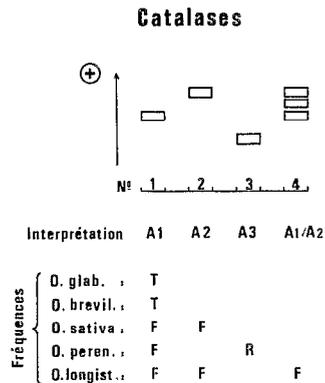


CATALASES (CAT) Fig. 6

-----

La même bande est fréquemment observée chez toutes les espèces du groupe *sativa* mais trois électromorphes sont au total distingués.

Les hétérozygotes ont un Z. à trois bandes.



PEROXYDASES (POX) Fig. 7

-----

Les Z. cathodiques et anodiques observés sont présentés dans la figure 7 pour les pH 6,0 et 8,0 (les Z. anodiques sont similaires pour les deux pH).

Chez *O. perennis* et *O. longistaminata* les familles de bandes B et C sont très polymorphes et seule la zone de variation a été limitée. On note qu'elle est plus étendue que celle des espèces cultivées, particulièrement pour *O. longistaminata*.

Les bandes E1 et E2 distinguent (sans exception relevée) les 2 espèces cultivées. Chez *O. breviligulata*, la bande E2 ne se rencontre qu'à l'Est du lac Tchad et en Afrique de l'Est et du Sud.

Le cas d'un hybride entre deux plantes d'*O. breviligulata* présentant les bandes B1 et B2 a été étudié. L'hybride F1 a une bande plus large englobant les bandes B1 et B2. La génération F2 ségrège mais la bande hybride se distingue mal de la bande B1. En regroupant les 2 classes on obtient un rapport 3 : B1 pour 1 : B2 (53 et 14 plantes) correspondant à l'hypothèse de 2 allèles codominants au même locus.

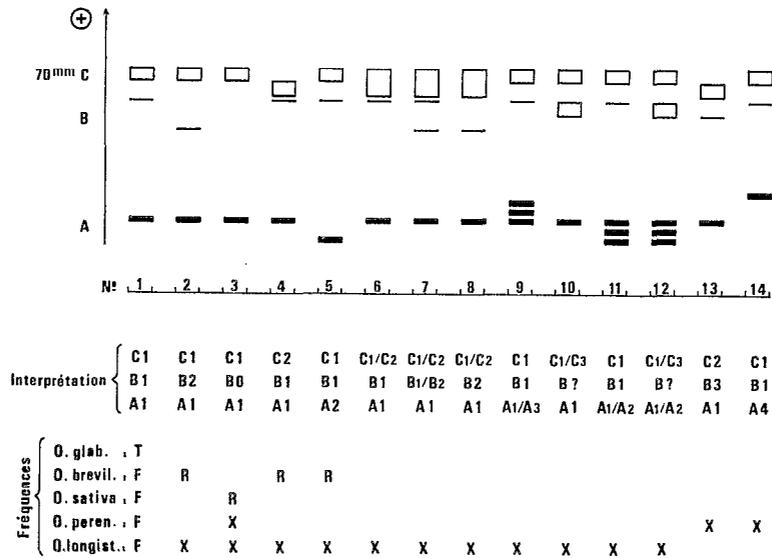


GLUTAMATE OXALOACETATE TRANSAMINASE (GOT) Fig. 8

-----

Comme pour les estérases, les Z. de G.O.T. sont variables selon le stade de la feuille utilisée. Les Z. obtenus avec des feuilles développées sont présentés. Le même Z. 1 est fréquent dans toutes les espèces mais un grand nombre de variantes se trouvent dans les espèces sauvages.

**ZYMOGRAMMES DE GLUTAMATE-OXALATE-TRANSAMINASES**

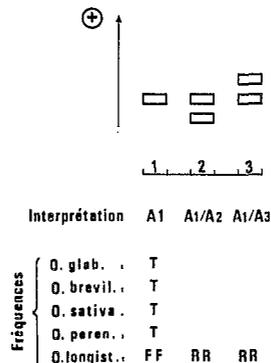


PHOSPHOGLUCOMUTASE (PGM) Fig. 9

-----

Cette enzyme très variable chez d'autres organismes (*Drosophile* en particulier), présente, à de rares exceptions près chez *O. longistaminata*, toujours un Z. à une bande chez toutes les espèces du groupe *Sativa*.

**Phospho - Gluco - Mutases**



ESTERASES (EST) Fig. 10  
-----

Les estérases non spécifiques (substrat : formes  $\alpha$  et  $\beta$  du Naphtyl acétate) sont un groupe enzymatique très hétérogène, avec des bandes caractérisées par leur aspect (coloration rouge à noire, diffusion, densité et subdivision éventuelle. Voir le tableau 4).

Les Z. sont complexes et variables pour une même lignée en fonction du stade de la feuille prélevée et dans une moindre mesure en fonction du stade de la plante. Les différences portent sur la présence/absence de certaines bandes, leur intensité de coloration ou leur déroulement éventuel, la position de la bande principale n'étant pas modifiée.

Après des essais préliminaires, nous avons choisi d'analyser chaque plante sur des feuilles prélevées aux 2 stades suivants : jeune feuille en développement sur une plantule et limbe de feuille entièrement développée sur une plante au stade du tallage. Lorsqu'un doute subsiste sur la présence ou l'absence d'une bande, l'analyse est répétée. Les Z. de la figure 10 cumulent les bandes lues sur les analyses des deux stades. Ceci réduit la possibilité que l'absence d'une bande soit liée au stade physiologique plutôt qu'à une différence génique simple.

Dans ces conditions, la diversité entre les Z. des espèces du genre *Oryza* est très importante et les possibilités de révélation sont saturées. L'aspect des bandes est très divers.

Seuls les Z. caractéristiques des espèces autogames *O. sativa*, *O. glaberrima* et *O. breviligulata* (respectivement 27, 17 et 4 Z.) sont tous présentés dans la fig. 10 avec quelques exemples représentatifs des autres espèces du groupe *sativa*.

Les 20 bandes clairement observées dans les 3 espèces citées sont regroupées selon leur aspect et leur répartition entre les Z. en 10 familles (A à J) qui migrent anodiquement et 1 famille (Ca) migrant vers la cathode. Aucun des groupes A à J n'est représenté dans les Z. qui ont une "richesse" variable en bandes.

Le tableau 4 présente quelques caractéristiques de ces familles de bandes à deux stades de développement des feuilles. On remarque que la présence de certaines bandes est particulièrement sensible au stade des feuilles. Il n'est pas exclu que d'autres facteurs, tels que la saison, interviennent également ? L'utilisation de témoins est donc indispensable pour chaque migration.

Aucun des Z. n'est identique entre *O. breviligulata* et *O. glaberrima* d'une part et *O. sativa* d'autre part.

La bande J est notée absente d'*O. breviligulata*. On remarque cependant sur tous les Z. une bande de très faible intensité à la position J2. De même, l'absence des bandes E dans des Z. de l'espèce *O. sativa* correspond chez certaines variétés à une bande de très faible intensité à la position E1.

Bandes	Intensité * de coloration		Couleur	Aspect	Remarques
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>			
Ca	++	-	Brun rouge	Fine	Parfois peu visible Mieux distinguée à pH 8,0 de migration
A	+	+	Noire	Diffuse	Souvent assez peu distinguable
B	+++	++	Noire	Épaisse, par- fois dédoublée	Disparaît aux stades âgés de la feuille
C	+	++	Noire	Diffuse et dédoublée	Souvent assez peu distinguable Superposée à D
D	+++	+++	Rouge	Dédoublée	Très nette
E	+++	+++	Brune	Fine	Très nette
F <sub>1</sub>	++	-	Brune	Fine	Très sensible au stade. Apparaît le mieux sur des parties blan- ches de feuilles F <sub>1</sub>
F <sub>2</sub>	+	+++	Brune	1/2 épaisse	Superposée à H mais de colora- tion plus intense. Son homologie avec F <sub>1</sub> n'est pas certaine.
G	++	+	Brune	Fine	Disparaît chez les feuilles dé- veloppées des espèces autogames africaines.
H	++	+	Brune	Fine	Invisible en présence de F <sub>2</sub>
I	++	+++	Brune	Diffuse	Parfois dédoublée.
J	-	+++	Brune	Fine	Intensité variable selon les individus.

TABLEAU 4 : Quelques caractéristiques d'aspect des bandes d'estérases, à deux stades de développement des feuilles.

\* : - bande absente  
+ 3 degrés relatifs d'intensité de coloration selon le nombre de  
croix

F<sub>1</sub> : Partie verte d'une jeune feuille en développement

F<sub>2</sub> : Limbe d'une feuille entièrement développée.



NAKAGAHRA (1977) a isolé 3 loci d'estérases : Est 1, 2 et 3. Bien que notre méthode de révélation des Z. soit très différente, nous avons mis en évidence, par étude des mêmes variétés avec les deux méthodes (18 variétés représentant les 11 génotypes observés), l'identité entre ces loci et ceux que nous avons symbolisés respectivement D, E et J.

Dans l'espèce *O. glaberrima*, l'allèle nul Io ne se rencontre que parmi l'écotype "flottant" alors que l'allèle Ho n'est présent que parmi l'écotype "dressé".

Dans les populations sauvages d'*O. breviligulata*, il existe un cline dans la distribution géographique de l'espèce pour la fréquence des mêmes allèles Io et Ho, de part et d'autre du Lac Tchad, approximativement : Io est fréquent à l'Est et au Sud et Ho à l'Ouest.

Par contre, parmi *O. breviligulata* adventice, Io est fréquent dans les populations des rizières du delta du Niger au Mali et de l'embouchure du fleuve Sénégal ce qui les distingue des populations sauvages voisines.

Plusieurs bandes, toujours observées chez *O. glaberrima* et *O. breviligulata* (parfois absentes d'*O. sativa*) ne se trouvent que très rarement chez *O. longistaminata*. Il s'agit principalement des bandes D1, E1 et E2. Par contre d'autres bandes sont toujours (Ca1) ou fréquemment (B1) présentes chez *O. longistaminata* comme dans les espèces cultivées.

La lecture des bandes d'estérases est délicate avec l'espèce *O. longistaminata* pour deux raisons :

- 1) chevauchement de certaines bandes ;
- 2) fréquence de bandes peu colorées qui s'expliquent parfois par l'hétérozygotie avec un électromorphe muet.

La distribution panmixtique des génotypes a été vérifiée au locus E pour les électromorphes E3 et E4. (Voir le tableau 1-4).

*O. perennis* de forme océanienne est par contre très différent, aucune bande anodique fréquente chez les espèces cultivées n'étant retrouvée dans ses Z. Il en va de même pour les autres espèces du genre *Oryza* (généomes B à F).

## PHOSPHATASES ACIDES (PAC) Fig. 11

Les Z. obtenus avec le tampon de migration à base de borate ont été décrits en détail préalablement et leur déterminisme génétique analysé (PAI, ENDO et OKA, 1975).

Nous suivrons donc l'interprétation génétique et la symbolisation proposée.

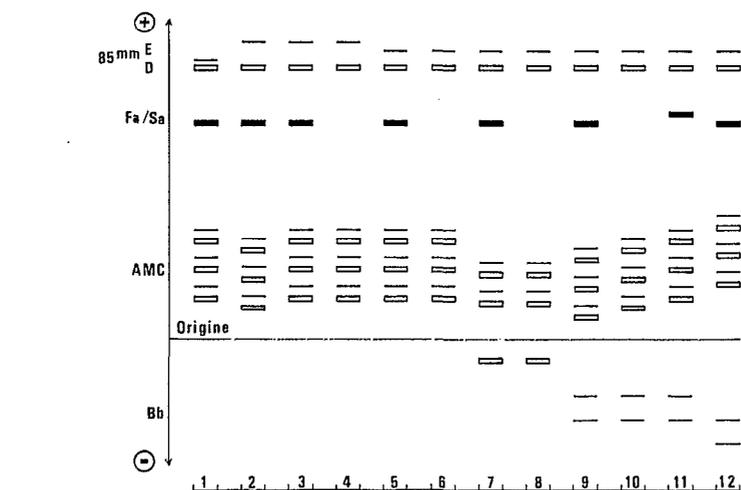
Un groupe de bandes anodiques rapides supplémentaires a été observé (bandes E) avec, dans l'espèce *O. breviligulata*, des variants lents et rapides par rapport à la bande commune aux différentes espèces.

Les zymogrammes des espèces autogames sont présentés dans la figure 11 avec quelques exemples pour l'espèce *O. longistaminata* chez laquelle les différentes figures hétérozygotes possibles ont été observées.

*O. longistaminata* se distingue par la présence des bandes Bb et la fréquence des électromorphes + 4 et + 6 du groupe AMC qui sont absents dans les espèces cultivées et rares chez *O. breviligulata*.

Dans l'espèce *O. sativa*, le groupe *japonica* est caractérisé par l'électromorphe AMC : + 9 et l'absence de la bande Fa alors que les électromorphes AMC : - 4 et Fa caractérisent le groupe *Indica* (SHAHI MORISCHIMA et OKA, 1969). *O. glaberrima* présente une autre combinaison: AMC : + 9 et Fa.

## ZYMOGRAMMES DE PHOSPHATASES ACIDES



Interprétation*	E	3	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
	Fa/Sa	Fa	Fa	Fa	0	Fa	0	Fa	0	Fa	0	Sa? Fa
	AMC	+9	+6	+9	+9	+9	+9	-4	-4	+4	+6	+9 +12
	Bb	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1 2

\*. après Pai et al (1975) pour Fa/Sa - AMC et Bb.

Fréquences	<i>O. glab.</i>					F	R					
	<i>O. brevil.</i>	R	R	R	R	F	R					
	<i>O. sativa</i>					R	F	F	R			
	<i>O. longist.</i> **									F	F	R R

\*\* , quelques exemples seulement.

## LEUCINE AMINO PEPTIDASES (LAP) Fig. 12

4 à 5 bandes anodiques sont généralement visibles dans les Z. des espèces cultivées et *O. breviligulata*. Elles sont symbolisées de A à E. Les Z. d'*O. longistaminata* sont plus variables : les bandes lentes, toujours moins intensément colorées, sont souvent peu visibles dans cette espèce sans doute à cause de l'hétérozygotie avec des allèles nuls. Elles n'ont pas été lues.

Les bandes E, sont les plus fortement colorées. On distingue 6 positions lorsque les Z. sont sur une même plaque de migration. Des différences plus minimes semblent exister mais ne sont pas systématiquement répétées. Les bandes E1, E2 et E3, plus lentes se rencontrent dans les espèces cultivées et *O. breviligulata* alors qu'*O. longistaminata* a des bandes E plus rapides : E4, E5 et E6. Si l'on mélange des extraits d'*O. longistaminata* avec une autre espèce, toutes les bandes se retrouvent dans le Z. obtenu.

Un hybride entre des plantes présentant les électromorphes E1 et E3 a été étudié dans l'espèce *O. breviligulata*. On note les deux bandes parentales sans bande hybride. La génération F3 ségrège selon le ratio 1-1-2 pour les deux phénotypes parentaux et l'hybride (32 - 28 et 82 plantes respectivement).

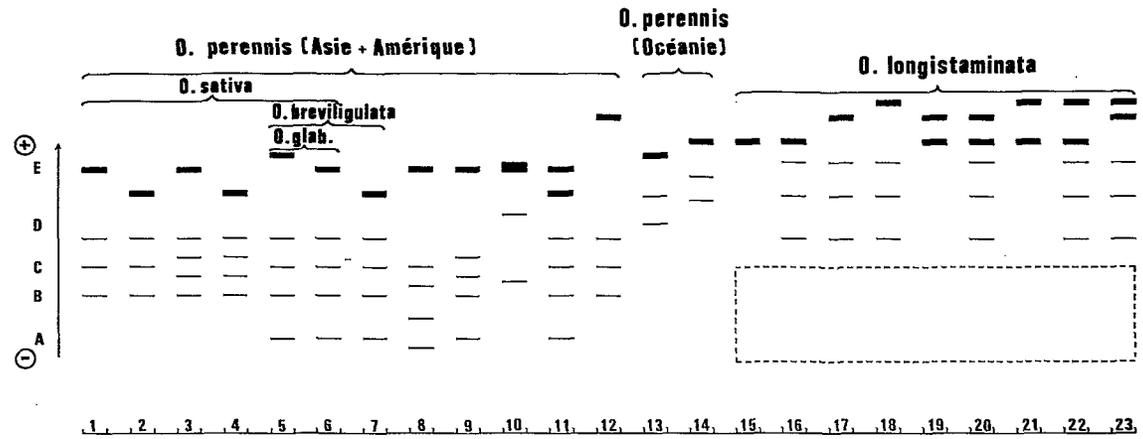
Les diverses combinaisons 2 à 2 des bandes E4, E5 et E6 ont été observées dans l'espèce *O. longistaminata*. La distribution panmictique des génotypes pour le locus E a été vérifiée (voir tableau 1-5).

Les trois bandes voisines des bandes E chez *O. longistaminata* se comportent comme une bande unique pour leur présence et absence. On peut donc les considérer comme représentant un seul électromorphe : D2. Chez les espèces cultivées, seule la bande la plus lente est clairement visible dans tous les cas, mais les deux autres apparaissent parfois faiblement.

La bande C se subdivise également dans certains Z.

*O. perennis* fait une transition dans le polymorphisme de ses Z. entre les espèces cultivées et *O. longistaminata*. Seules les formes asiatiques et américaines partagent parfois les mêmes Z. que les espèces cultivées.

### ZYMOGRAMMES DE LEUCINE AMINO-PEPTIDASES



Interprétation	E1	E2	E1	E2	E3	E1	E2	E1	E1	E7?	E1/E2	E5	E3	E4	E4	E4	E5	E6	E4/E6	E4/E5	E4/E6	E4/E6	E5/E6
	D1	D0	D0	D?	D1	D1	D3	D4	D0/D0	D2/-	D2/-	D2/-	D0/D0	D2/-	D0/D0	D2/-	D2/-						
	C1	C1	C2	C2	C1	C1	C1																
	A0	A0	A0	A0	A1	A1	A1																

Fréquences	O. glab.					R	FF																
	O. brevil.					R	F	R															
	O. sativa	F	R	F	R	RR	F																
	O. longist.														F	F	R	R	R	F	R	F	R

PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE (PGI) Fig. 13

-----

Les PGI montrent un important polymorphisme dans la mobilité des isozymes mais présentent typiquement un Z. à 3 bandes chez les espèces autogames. Les bandes sont dédoublées avec des extraits de jeunes feuilles mais simples avec des extraits de feuilles entièrement développées. Des extraits de coléoptiles ou de radicules séminales donnent des bandes plus fines et les mêmes Z. que sur feuilles adultes sont révélés.

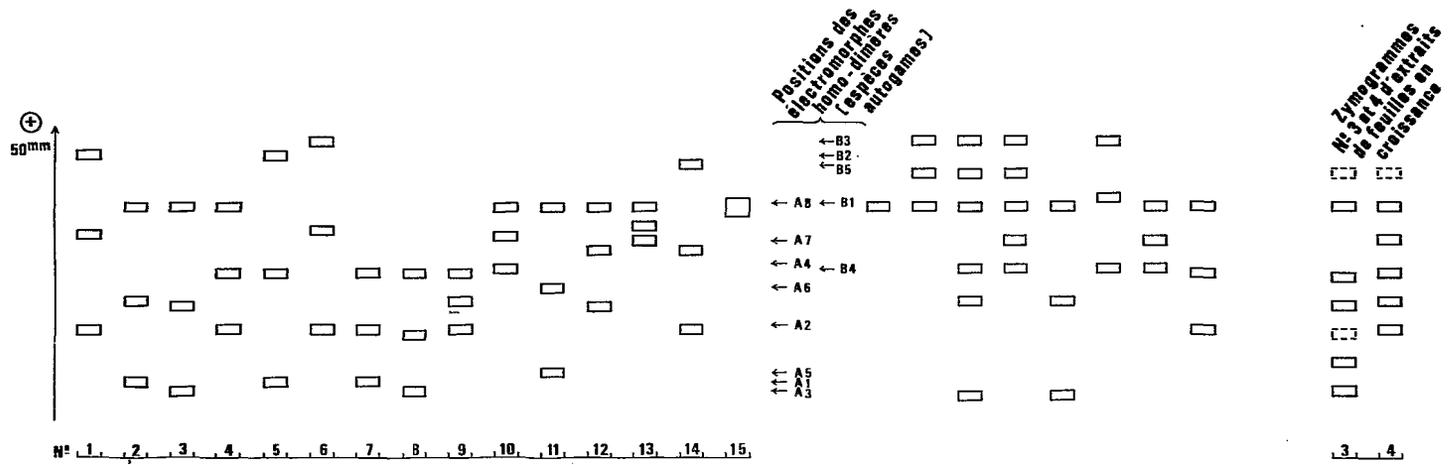
Des zymogrammes à 1, 3 ou 4 à 7 bandes sont observés parmi l'espèce *O. longistaminata*.

Tous les zymogrammes observés s'expliquent par la dimérisation au hasard du produit de deux loci selon le modèle présenté pour les bandes AA, AB et BB des MDH. Les Z. à une bande semblent résulter de la superposition des produits des deux loci car la coloration de cette bande unique est généralement plus intense. Le double hétérozygote produisant quatre monomères différents, dix associations dimères sont possibles. En fait aucun Z. à plus de 7 bandes n'a été observé ce qui s'explique par la superposition de plusieurs composés dimères dans le Z. Par exemple un hybride entre des plantes présentant les Z. 4 et 7 a un Z. observé à 7 bandes car les dimères suivants sont regroupés :  $A_2 B_1$  et  $B_4 B_4$ ,  $A_1 B_1$  et  $A_2 B_4$ ,  $A_2 A_2$  et  $A_1 B_4$

Niveau relatif de charge	Bandes et zymogrammes correspondants			
Co	$B_1 B_1$	$B_1 B_1$	$B_1 B_1$	
- 1	$B_1 A_4$			
- 2	$A_4 A_4$	$B_1 A_2$		$B_4 B_4$
- 3			$B_1 A_3$	
- 4		$A_2 A_2$		$B_4 A_3$
- 5				
- 6			$A_3 A_3$	$A_3 A_3$
Zymogramme	N° 10	N° 4	N° 3	N° 8

TABLEAU 5 : Interprétation de 4 zymogramme de P.G.I. d'*O. brevisgulata* par des modifications discrètes de charges des produits alléliques.

## ZYMOGRAMMES DE PHOSPHO-GLUCOSE-ISOMERASES



Interprétation { B2 B1 B1 B1 B2 B3 B4 B4 B4 B1 B1 B1 B1 B5 B1  
A2 A1 A3 A2 A1 A2 A1 A3 A2 A4 A5 A6 A7 A2 A8

Fréquences intra-spécifiques	O. glaberrima :		F	R														
	O. breviligulata :		F	F	F		R	R	R	R								
	O. sativa :	R	F	F	R	RR												
	O. peren. Asie :		X	X					X					X	X			
	O. " Amér. :			X														X
	O. " Océa. :									X	X	X						

\* Population LL 116 seulement

F F R R RR RR RR RR \*

Les différences de mobilité correspondent soit à des variations très minimes qui ne sont décelables qu'entre Z. placés sur la même plaque et de préférence côte à côte (bandes  $A_1$ ,  $A_1$  et  $A_2$ ,  $A_2$  par exemple) soit à des modifications correspondants *grosso modo*, au tiers ou à la moitié de la distance qui sépare les bandes extrêmes observées dans une espèce donnée. (Comparer les Z. 3, 4 et 10 dans *O. breviligulata* et 11, 12 et 13 dans *O. perennis* océanien par exemple. Ces différences importantes de vitesse de migration qui correspondent à des multiples d'environ 0,7 cm sur le gel représentent probablement des différences "unitaires" de charge (voir l'interprétation de quelques Z. sur le tableau 5).

Dans *O. breviligulata*, comme dans *O. perennis* océanien les trois mêmes "états de charges" (MARSHALL et BROWN, 1975) sont ainsi distingués pour les produits homodimères du locus A. Dans l'espèce *O. longistaminata* on note ces trois états de charge et deux supplémentaires : l'un, plus chargé (mobilité rapide) conduit à la superposition de tous les produits géniques (Z. à une bande). L'autre, moins chargé est représenté par une bande lente caractéristique de certaines populations d'Afrique de l'Est (le Z. correspondant n'est pas porté sur la fig. 13 qui présente l'exemple d'une population du Mali). Cinq états de charges sont donc décelés pour les produits du locus A. De même, trois états de charge sont distingués avec les produits B : états  $B_1$  et variants  $\pm 1$  unité. On remarque que les différences subtiles de vitesse de migration (de l'ordre du mm ou moins) distinguent mieux les espèces que les états de charge. Ces petites différences sont modifiées selon le pH de migration et la concentration en amidon de gel. Elles peuvent être interprétées (MARSHALL et BROWN, 1975 - JOHNSON, 1977) comme résultants : 1) d'une substitution d'acides aminés appartenant à la même classe de charge mais qui ont des pH différents, 2) de substitutions d'acides aminés en des points différents de la molécule, 3) de différences dans la conformation des molécules (éventuellement épigénétiques ?).

Les Z. présentés sur la fig. 13 sont observés avec des migrations à pH 8,0 (s'abaissant au cours de la migration) et avec des gels à 14% d'amidon (par rapport au poids de tampon) qui représentent les meilleures conditions essayées. Les espèces *O. sativa* et *O. breviligulata* partagent l'électromorphe  $B_1$  sur le diagramme. Notons qu'en fait une différence très minime de vitesse de migration sépare les bandes présentées par les deux espèces.

A droite de la fig. 13, on a porté les Z. 3 et 4 observés avec des feuilles en croissance (partie non chlorophyllienne). On remarque que le dédoublement des bandes semble correspondre au gain d'une ou deux unités de charge.

Le Z. 6 n'a été rencontré que dans une variété d'*O. sativa* récoltée au Mali dans une rizière du delta du Niger où les deux espèces sont cultivées en mélange avec *O. breviligulata* et *O. longistaminata*. L'électromorphe  $B_3$  qui le caractérise correspond exactement à l'électromorphe "rapide" d'*O. longistaminata*, très fréquent dans les populations de cette région. Cette variété d'*O. sativa* a probablement introgressé des gènes de l'espèce parente *O. longistaminata*.

## B) THERMOSENSIBILITE DES ISOZYMES SEPARES PAR ELECTROPHORESE

60 lignées représentant l'ensemble de la collection disponible pour les espèces autogames *O. breviligulata*, *O. stapfii*, *O. glaberrima* et *O. sativa* ont été étudiées pour 10 enzymes (LAP, GOT et GDH exclues) représentant 30 loci présumés. Une hétérogénéité dans la sensibilité à la température entre lignées a été clairement mise en évidence au niveau de 7 loci seulement. (EST : F ; CAT : A ; MDH : A, B et C ; PGI : A et B). Un échantillonnage complémentaire pour les espèces africaines, soit 171 lignées au total a été étudié pour ces quatre enzymes retenus (voir le tableau 6 pour la répartition par espèces).

Les premiers résultats de l'analyse mendélienne montrent que le polymorphisme mis en évidence est lié aux allèles codant les isozymes considérés. Nous appellerons "électrothermomorphes" une classe d'allèles ayant un phénotype commun en électrophorèse et tests de thermosensibilité.

Le tableau 6 indique le profil de dénaturation des produits homomères de 27 électrothermomorphes représentant 16 électromorphes dont 8 se révèlent hétérogènes. 17 "thermomorphes" sont distingués au niveau des 7 loci retenus. Les bandes hétérodimères ont dans tous les cas une sensibilité intermédiaire entre celle des bandes homomères.

Avec les espèces *O. glaberrima* et *O. stapfii*, aucune hétérogénéité n'est mise en évidence parmi les électromorphes qui les caractérisent.

*O. sativa* présente une hétérogénéité au niveau de deux électromorphes : MDH : A<sub>1</sub> et EST : F<sub>2</sub>.

Une hétérogénéité des électromorphes est beaucoup plus fréquemment mise en évidence au niveau d'*O. breviligulata*. Dans tous les cas, l'électrothermomorphe le plus fréquent est celui dont les produits homomères sont les plus résistants à la température.

Aucun électrothermomorphe du groupe A des P.G.I. n'est commun aux espèces *O. glaberrima* et *O. sativa* bien que leur phénotype de migration dans le gel d'amidon soit voisin (A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub>) ou identique (A<sub>2</sub>).

6 électrothermomorphes du groupe A des P.G.I. sont distingués dans l'espèce *O. breviligulata*.

Dans les populations d'*O. longistaminata*, les classes de résistance à la température 53, 56 et 59° sont également observées pour les PGI : A et B. L'hétérozygotie de cette espèce complique cependant le dénombrement direct des électrothermomorphes.

L'électrothermomorphe PGI : B<sub>1</sub> 59° est également fréquent dans les populations d'*O. perennis* australien alors que ce sont les formes B<sub>1</sub> 56° qui sont rencontrées dans les espèces africaines et *O. sativa*.

Electrothermo- morphes	Températures (20 mn)								NOMBRE DE LIGNEES PAR ESPECES				
	44°	47°	50°	53°	56°	59°	62°	65°	<i>sativa</i>	<i>glaberima</i>	<i>stapfli</i>	<i>breviligata</i>	
<u>Est. :</u>													
F2 53°	+++ *	+++	+++	+++	ε				13	-	-	-	
F2 50°	+++	+++	+++	ε	-				7	-	-	-	
<u>Cat. :</u>													
A1 et A2 47°	+++	+++	-						41	32	30	65	
A1 44°	+++	-	-									3	
<u>M.D.H.</u>													
A1 62°			+++	+++	+++	+++	+++	-	40	32	30	56	
A1-A2 et A3 56°			+++	+++	+++	-	-	-	1	-	-	2	
B1 62°			+++	+++	+++	+++	+++	-	41	32	30	67	
B1 59°			+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	1	
C1 56°			+++	+++	+++	-	-	-	41	32	30	66	
C1 53°			+++	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
<u>P.G.I.</u>													
A1-A2 et A3 59°			+++	+++	+++	+++	-	-	41 (A1 et A2)	26 (A3)	24 (A3)	25 (A3)	
A2 et A4 56°			+++	+++	+++	ε	-	-		6 (A2)	6 (A2)	29 (A2 et A4)	
A1 56°			+++	+++	+	-	-	-				9	
A1 et A2 53°			+++	++	-	-	-	-				4	
A1 50°			+++	-	-	-	-	-				1	
B1-B2 ) B3-B4 )			+++	+++	+++		-	-	41 (B1-B2-B3)	32 (B1)	30 (B1)	67 (B1 et B4)	
B4 53°			+++	+	-	-	-	-				1	
									Total	41	32	30	68

Tableau 6 : Profil de dénaturation et répartition spécifique de 27 électrothermomorphes.

\* : +++ : activité normale  
 ++ : activité réduite  
 ε : traces d'activité  
 - : pas d'activité

## DISCUSSION

L'observation du polymorphisme enzymatique est un descripteur puissant pour l'étude de la variabilité génétique du genre *Oryza*. Ceci est d'autant plus important que les gènes déterminants des différences morphologiques frappantes sont peu nombreux et peu utilisables pour les études de phylogénèse dans ce genre (OKA, 1974).

Treize zymogrammes ont été étudiés. On pourrait y ajouter ceux des lactates déshydrogénases dont le polymorphisme semble être important et variable selon l'ontogénèse mais ils n'ont pas été étudiés en détail, et d'autres tels que les phosphokinases qui donnent des zymogrammes polymorphes mais dont l'intensité de coloration est très faible.

Certaines enzymes (EST, POX, PAC, PGI, GOT, PGD...) sont particulièrement intéressantes pour mettre en évidence des différences intervariétales entre les riz cultivés. Des marqueurs plus nombreux seraient néanmoins nécessaires pour une étude plus fine du polymorphisme des espèces cultivées et de leurs relations avec les espèces ancestrales.

L'analyse systématique de tous les stades de l'ontogénèse pourrait fournir de nouveaux marqueurs avec les mêmes enzymes, particulièrement EST, POX, PAC.

L'interprétation génétique des zymogrammes et de leur sensibilité à la température doit être poursuivie par analyse mendélienne. Au niveau interspécifique ou entre les différents types de riz cultivés, cette analyse n'est pas toujours possible avec précision en fonction des barrières reproductives et des phénomènes de sélection gamétique rencontrés. Pour des familles enzymatiques complexes, telles que les estérases, d'autres tests devraient permettre d'étudier la parenté génique entre les isozymes : utilisation d'inhibiteurs et de substrats spécifiques par exemple.

L'exemple des PGI montre que les états de charge sont moins discriminants au niveau interspécifique que d'autres caractéristiques conduisant à des modifications plus subtiles de la mobilité en électrophorèse. De tels différences minimes sont pressenties pour d'autres enzymes, par exemple au niveau des bandes E des LAP mais elles ne sont généralement pas suffisamment importantes pour être prises en compte de manière répétable. On peut alors se demander si ces différences ne passent pas généralement inaperçues et l'on doit examiner les similitudes observées entre espèces avec beaucoup de circonspection.

Un test "croisé" par rapport à la séparation par les états de charge, tel que l'étude de thermostabilité, met clairement en évidence l'hétérogénéité des électromorphes, particulièrement entre les espèces. Il semble que le polymorphisme observé par thermosensibilité soit corrélé à l'importance du polymorphisme révélé par électrophorèse. Autrement dit les loci présentant le plus d'électromorphes présentent également le plus de thermomorphes et réciproquement. Ceci doit donner confiance sur la qualité de la méthode d'électrophorèse pour distinguer une certaine

proportion des allèles mais rien n'est connu sur l'importance du polymorphisme "résiduel" qui n'est mis en évidence par aucune des deux méthodes utilisées.

Les espèces qui ont été analysées sont inégalement échantillonnées. En particulier, *O. perennis* doit être mieux représenté si l'on veut pouvoir préciser ses relations avec les différents types de riz cultivés et les autres espèces du groupe *sativa*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHU, Y.E., 1967. Variations in peroxidases isozymes of *Oryza perennis* and *O. sativa*.  
Japan J. Genetics. Vol 42, N° 4 : 233-244.
- CHU, Y.E. and H.I. OKA, 1967. Comparison of variations in peroxidase isozymes between *perennis* - *sativa* and *breviligulata* - *glaberrima* series of *oryza*. Botanical bulletin of Academia Sinica. Vol VIII. Special Number.
- CHU, Y.E. and H.I. OKA, 1970. The genetic basis of crossing barriers between *Oryza perennis subsp. barthii* and its related taxa. Evolution 24 : 135-144.
- HARRIS, H. and D.A. HOPKINSON, 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland publishing Company, Amsterdam. Oxford - American elsevier publishing Company, Inc., New York.
- JOHNSON, G.B., 1977. Characterisation of electrophoretically cryptic variation in the alpine butterfly *Colias meadii*. Biochemical Genetics, Vol. 15, N° 7/8, 665-693.
- KING, J.L. and OHTA, T., 1975. Polyallelic mutational equilibria. Genetics 79 : 681-691.
- MARSHALL, D.R. and A.H.D. BROWN, 1975. The charge state model of protein polymorphism in natural populations. J. Mol. Evol. 6, 149-163.
- MORISHIMA, H., 1969. Phenetic similarity and phylogenetic relationships among strains of *Oryza perennis*, estimated by methods of numerical taxonomy. Evolution - 23 N° 3 : 429-443.
- NAKAGAHRA, M., 1977. Genetic analysis for esterases isoenzymes in rice cultivars. Japan J. Breed. 27 (2) : 141-148.
- NAKAGAHRA, M., T. AKIHAMA and K.I. HAYASHI, 1975. Genetic variation and Geographic cline of esterase isoenzymes in native rice varieties. Japan J. Genetics. Vol 50, N° 5 : 373-382.

- OKA, H.I., 1974. Experimental studies on the origin of cultivated rice.  
Genetics 78 : 475-486.
- PAI, C., T. ENDO and H.I. OKA, 1973. Genic analysis for peroxidases isozymes and their organ specificity in *Oryza perennis* and *O. sativa*.  
Can. J. Genet. Cytol. 15 : 845-853.
- PAI, C., ENDO, T. and OKA, H.I., 1975. Genic analysis for acid phosphatase isozymes in *Oryza perennis* and *O. sativa*.  
Can. J. Genet. Cytol. 17 : 637-650.
- SHAHI, B.B., Y.E. CHU and H.I. OKA, 1969. Analysis of gene controlling peroxidase isozymes in *Oryza sativa* and *O. perennis*.  
Japan. J. Genetics Vol. 44, N° 5 : 321-328.
- SHAHI, B.B., H. MORISHIMA, and H.I. OKA, 1969. A survey of variations in peroxidase, acid phosphatase and esterase isozymes of wild and cultivated *oryza species*.  
Japan J. Genetics. Vol. 44, N° 5 : 303-319.
- TROUSLOT, P. et G. SECOND, 1980. Technique d'électrophorèse en gel d'amidon appliquée à l'étude de quatorze enzymes du riz. In : Electrophorèse d'enzymes de riz. Travaux et Documents O.R.S.T.O.M. - N° 120.

\*

### Remerciements

Nous tenons à remercier particulièrement MM. Clément BOKA et Félix GUELA BLEDY pour leur constante collaboration technique.

Second Gérard, Trouslot Pierre. (1980).

Polymorphisme de treize zymogrammes observés parmi diverses espèces sauvages et cultivées du genre *Oryza* : tome 2.

Paris : ORSTOM, (120), 49-88.

(Travaux et Documents de l'ORSTOM ; 120). ISBN 2-7099-0569-8