

**TRAVAUX
ET DOCUMENTS
DE L'O.R.S.T.O.M.**

ÉLECTROPHORÈSE D'ENZYMES DE RIZ

[ORYZA Sp]



G. Second, P. Trouslot



**ÉDITIONS DE L'OFFICE
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ET TECHNIQUE OUTRE-MER**

Pour tous renseignements, abonnement aux revues périodiques, achat d'ouvrages et de cartes, ou demande de catalogue, s'adresser au :

**SERVICE DES PUBLICATIONS DE L'O.R.S.T.O.M.
70-74, route d'Aulnay - 93140 BONDY (France)**

Les paiements sont à effectuer par virement postal au nom de *Service des Publications O.R.S.T.O.M.*, C.C.P. 22.272.21.Y PARIS (à défaut par chèque bancaire barré à ce même libellé).

Nous vous signalons, dans la collection «Mémoires de l'ORSTOM» :

n° 75 Organisation évolutive d'un groupe agamique : la section des *Maximae* du genre *Panicum* (Graminées)

J. PERNÈS

106 p. 21x27 ; I.S.B.N. : 2-7099-0368-7 F. 48,00 h.t.

n° 77 Polymorphisme et modes de reproduction dans la section des *Maximae* du genre *Panicum* (Graminées) en Afrique

D. COMBES

99 p. 21x27 ; I.S.B.N. : 2-7099-0371-7 F. 48,00 h.t.

ADDENDA au TD n° 120 - Électrophorèse d'enzymes de riz

1 - Pour réaliser des migrations longues (16 h ; pendant la nuit) les modifications suivantes peuvent être apportées :

Système A (p. 35) :

Tampon «Gel». Histidine mono HCl 15mM, pH 6,0 ajusté avec NaOH (préparé concentré 10 fois)

Tampon «Bac». Inchangé.

Appliquer un courant constant tel que la tension au départ soit de 3V/Cm environ (à moduler selon le modèle des moules, la concentration en amidon...)

Système B (p. 35)

Tampon «Gel». Histidine mono HCl 15mM, pH 7,5 (à 27° C) ajusté avec Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (Préparé concentré 10 fois)

Tampon «Bac». Tris (hydroxy) aminométhane 0,4 M ajusté à pH 7,5 (à 27° C) avec de l'acide citrique (concentration finale 0,12 m environ) - (Préparé concentré 5 fois)

N.B. - Le pH des tampons contenant Tris augmente considérablement lorsque la température baisse (environ pH 8.0 à 4° C)

Appliquer un courant constant tel que la tension soit environ de 4V/Cm au départ

La diffusion des bandes, plus importante pendant les migrations longues peut être limitée en utilisant des gels plus concentrés (15 à 16 g d'amidon pour 100 ml de tampon) et en augmentant l'intensité du courant en conséquence.

2 - Révélation des catalases : une recette améliorée est la suivante (modifiée de W. WOODBURY *et al.* *Analytical Biochemistry* 44 : 301-305. 1971)

— Après avoir laissé le gel d'amidon se réchauffer à la température ambiante pendant quelques minutes, l'immerger dans une solution de H₂O₂ à 0,03 % pendant cinq minutes ;

— Rincer abondamment à l'eau, puis immerger les gels dans une solution aqueuse de 0,4 % de chlorure ferrique (FeCl₃) et 0,4 % de ferrocyanate de potassium (K₃FeCN₆) préparée immédiatement avant l'emploi par dilution de solutions stock.

N.B. - La concentration et le temps d'exposition de la solution H₂O₂ doivent être ajustés de façon que la coloration complète de l'amidon (en vert foncé) apparaisse (en dehors des zones d'activité catalase) en 5 à 10 minutes.

Conserver les solutions stocks et les gels à l'obscurité. Des plaques colorées on pu ainsi être conservées au réfrigérateur pendant plusieurs mois.

3 - Révélation des PGI :

Comme pour les PGM, l'utilisation de MTT en place du NBT permet une coloration dans l'épaisseur de l'amidon et évite l'emploi de l'agar. On peut utiliser la formule suivante :

Fructose 6 phosphate (Sel de barium ou de sodium)	40 mg
MgSO ₄	120 mg
NADP	5 mg
Tampon Tris IM pH 8,5 (HCl ou ac. acétique)	10 ml
H ₂ O	90 ml

Juste avant l'emploi :

MTT 10 mg/ml de méthanol	1 ml
PMS 1,8 " "	1 ml
G ₆ PDH 400 Units/mg protein.	0,05 ml (= 20 U.)

4 - L'utilisation de plaques de 11 mm d'épaisseur ne pose pas de problèmes particuliers et permet d'obtenir 5 tranches intermédiaires de 1,5 mm d'épaisseur et une tranche de base de 2 mm.

ERRATUM (TD n° 120 - Electrophorèse d'enzymes de riz)

Couverture et page de garde : lire *Oryza spp* et non sp.

Page 20 : lire *Tampon Tris 0,5 M pH 8,5 (2) : 20 ml* et non 10 ml.

Page 28 : *Fast blue BB* doit être ajouté avant l'utilisation de la solution.

Page 29, avant dernière ligne : lire *50* et non 500.

Page 35, 10^e ligne : lire *2000* et non 200.

Page 36 : Solutions 5 et 6 : lire *15 g* et non 1,5 g.

Page 37 : le tampon II est une solution IM de malate Na.

Page 67 : Z.16 : lire A_3A_3 et non A_1A_3 .

Page 70 : Les 3 bandes du Z. 4 des catalases sont intermédiaires entre les bandes extrêmes A_1 et A_2 (Système à 5 bandes dont les 3 bandes hybrides sont seules bien visibles).

TRAVAUX ET DOCUMENTS DE L'O.R.S.T.O.M.

N° 120

ÉLECTROPHORÈSE D'ENZYMES DE RIZ

[*ORYZA Sp*]

G. Second, P. Trouslot

O.R.S.T.O.M.

PARIS

1980

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, « que les «copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées « à une utilisation collective» et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but « d'exemple et d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le « consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayant cause, est illicite» (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une « contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal».

.....
I.S.B.N. : 2-7099-0569-8

.....
© ORSTOM Paris 1980

ÉLECTROPHORÈSE D'ENZYMES DE RIZ

[*ORYZA Sp*]

I TECHNIQUE D'ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AMIDON APPLIQUÉE A L'ÉTUDE DU POLYMORPHISME DE QUATORZE ENZYMES DU RIZ

par P. TROUSLOT* et G. SECOND*

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

par G. SECOND* et P. TROUSLOT*

* LABORATOIRE DE GÉNÉTIQUE
ORSTOM – B.P. V 51 ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

présenté pour publication en novembre 1979

Sommaire

	Pages
I <u>TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON APPLIQUEE A L'ETUDE DE QUATORZE ENZYMES DU RIZ.....</u>	7
Summary - Résumé	9
Introduction	11
- METHODE D'ELECTROPHORESE	13
1 ^o) Préparation des gels	
2 ^o) Préparation des échantillons et mise en place..	
3 ^o) Migration	15
4 ^o) Choix du système en fonction de l'enzyme révélé	16
- REVELATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	19
1 ^o) Généralités	
2 ^o) Révélations à l'agar	
3 ^o) Fixation et conservation des plaques	
4 ^o) Procédés de révélation par enzyme	
- Alcool deshydrogénase	20
- Glutamate deshydrogénase	21
- Lactate deshydrogénase	22
- Malate deshydrogénase	23
- Isocitrate deshydrogénase	24
- Phosphogluconate deshydrogénase	25
- Catalase	26
- Peroxydase	27
- Glutamate - oxaloacétate transaminase	28
- Phosphoglucomutase	29
- Estérase	30
- Phosphatase acide	31
- Leucine aminopeptidase	32
- Phosphoglucose isomérase	33

	Pages
- COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISEES	35
- TECHNIQUE DE DENATURATION A LA CHALEUR DES ISOZYMES	39
Références bibliographiques	41
Photographies (Planches hors texte)	42
II <u>POLYMORPHISME DE TREIZE ZYMOGRAMMES OBSERVES PARMIS</u> <u>DIVERSES ESPECES SAUVAGES ET CULTIVEES DU GENRE ORYZA</u>	49
Summary - Résumé	51
Introduction	53
Matériel et Méthode	55
Résultats	
A) Présentation des zymogrammes	63
B) Thermosensibilité des isozymes séparés par électrophorèse	89
Discussion	91
Références bibliographiques	93

**TECHNIQUE D'ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AMIDON
APPLIQUÉE A L'ÉTUDE DU POLYMORPHISME DE
QUATORZE ENZYMES DU RIZ**

par

P. TROUSLOT et G. SECOND

Résumé

Une technique d'électrophorèse en gel d'amidon d'extraits bruts d'organes végétatifs de diverses espèces sauvages et cultivées de riz (*Oryza*) est décrite en détail. Un tampon Histidine - Citrate, pH 6,0 ou 8,0 est généralement utilisé. Des recettes de révélation de quatorze enzymes sont précisées.

L'importance du choix de l'organe échantillonné et de son stade apparaît primordiale pour l'obtention de zymogrammes interprétables.

Les conditions standards optimales trouvées pour l'analyse en série de nombreux échantillons sont indiquées pour chaque enzyme.

Un test pour l'étude de la thermosensibilité des isozymes après électrophorèse est aussi décrite.

Summary

An electrophoresis procedure in starch gel of crude vegetative organ extracts from various wild and cultivated rice (*Oryza*) species is described in detail. A Histidine Citrate buffer, pH 6,0 or 8,0 is usually utilized. The recipes for the staining of fourteen different enzymes are given.

The importance of the choice of the organs sampled and of their vegetative stages appears to be primordial in obtaining interpretable zymograms. Optimal standard conditions found for routine analysis of a great number of samples are given for each enzyme.

A test for the study of the heat stability of the isozymes after electrophoresis is also described.

INTRODUCTION

Un programme international de prospection et de collecte des ressources génétiques du riz (*Oryza*) en Afrique ayant été débuté en 1974 par l'ORSTOM et l'IRAT il fut décidé d'étudier la variabilité du matériel récolté par le polymorphisme enzymatique : s'agissant d'une étude génétique de populations, la technique choisie devait tout d'abord permettre d'analyser rapidement un grand nombre d'échantillons.

L'option pour la technique en plaque de gel d'amidon fût prise dès l'origine et sa souplesse d'utilisation (variété des tampons utilisables en particulier) ne devait pas en démentir le bien fondé. On s'est ensuite efforcé d'adopter un tampon réduisant les artéfacts de migration, convenant pour une grande variété d'enzymes et donnant une bonne résolution et un bon étalement des zymogrammes. Le tampon Histidine-Citrate (BREWER, 1970), utilisable avec une grande variété de pH, répond à ces critères sauf dans le cas des phosphatases acides pour lesquelles le tampon à base de Borate (SMITHIES, 1955) donne de bien meilleurs résultats.

Un système d'extraction, et de mise en place des extraits pour la migration, simple et rapide fut ensuite recherché. L'organe analysé fut choisit de manière à pouvoir échantillonner tous les individus viables, quelque soit l'espèce, à un stade précoce et sans destruction de la plante.

14 enzymes ont été étudiés :

- 8 oxydoréductases : Alcool déshydrogénase (ADH)
Glutamate déshydrogénase (GDH) Lactate déshydrogénase (LDH) Malate déshydrogénase (MDH) Isocitrate déshydrogénase (ICD) Phosphogluconate déshydrogénase (PGD) Catalase (CAT) Peroxydase (POX).

- 2 transférases : Glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) Phosphoglucomutase (PGM).

- 3 hydrolases : Estérase (EST) Phosphatase acide (PAC) Leucine aminopeptidase (LAP)

- 1 isomérase : Phospho-glucose isomérase (PGI).

L'observation des zymogrammes a mis en évidence une grande homologie de polymorphisme entre les espèces proches parentes. Nous avons donc recherché à révéler une hétérogénéité parmi les bandes similaires par utilisation de :

- différents pH de migration,
- différentes concentrations d'amidon,
- tests de thermostabilité des isozymes séparés.

La dernière méthode a donné des résultats particulièrement

encourageants et un test simple de thermostabilité des isozymes après électrophorèse a été mis au point.

Nous décrivons ici les techniques d'électrophorèse et de thermostabilité. La présentation des zymogrammes observés avec différentes espèces du genre *Oryza* sera publiée dans l'article suivant (SECOND et TROUSLOT, 1980).

La méthode présentée a été testée, en dehors du riz, sur le matériel suivant :

- Feuilles et graines de mil (*Pennisetum americanum*)
- Organes de la germination du maïs (*Zea mays*)
- Feuille de *Panicum maximum*
- Latex d'*Hevea brasiliensis*

elle est applicable, moyennant des modifications mineures et le choix de l'organe le plus adapté dans chaque situation.

Dans le cas de plantes, telles le caféier, dont les extraits foliaires sont riches en polyphénols et tannins, un procédé d'extraction particulier doit être adopté (TROUSOLT et BERTHOU, 1980).

MÉTHODE D'ÉLECTROPHORÈSE

1°) PRÉPARATION DES GELS

La méthode d'électrophorèse sur gel d'amidon en système horizontal utilisée s'inspire, avec quelques modifications, de la méthode décrite par SMITHIES (1955).

Dans un erlenmeyer de 500 ml la quantité nécessaire (28 g. pour un gel à 14% en poids de tampon) d'amidon hydrolysé (CONNAUGHT) est mélangée avec 200 ml de tampon. Le mélange est chauffé tout en agitant, jusqu'à $80^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ}$. A ce moment, le mélange change d'aspect et devient translucide. Il est alors immédiatement dégazé à l'aide d'une pompe à vide et versé dans un moule en plastique de dimensions intérieures 23 x 8 x 0,6 cm (Fig. 1a).

Une plaque de verre épaisse est appliquée pour chasser l'excès d'amidon et les éventuelles bulles d'air qui peuvent se former à la surface du gel. Elle est maintenue à l'aide de 4 pinces ACLE (Fig. 1b).

Les gels sont soit préparés 1 à 2 h avant la poursuite de la manipulation et refroidis dans un réfrigérateur, soit préparés la veille de la migration et conservés pendant 17 h environ à température ambiante. Avec le tampon à base d'histidine, ces derniers sont plus cassants et permettent une moins bonne résolution des bandes que les gels préparés peu de temps avant la migration.

La plaque de verre est retirée à l'aide d'un scalpel et le gel est coupé transversalement à 0,5 et 7 cm d'une des extrémités (Fig. 1c). La bande de 0,5 cm est retirée ce qui permet de déplacer la tranche de 6,5 cm de large du gel (c'est habituellement la partie "cathodique") afin de créer un espace pour la mise en place des échantillons (Fig. 1d).

2°) PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET MISE EN PLACE (Fig. 1e et

1f).

Elle est effectuée à température ambiante. Une petite quantité d'eau distillée est ajoutée avant broyage si nécessaire. Deux manières de broyer l'échantillon ont été utilisées selon la taille et la tendreté de l'organe échantillonné :

- L'organe est écrasé à l'aide d'une baguette en plexiglass dans une plaque à godets en porcelaine. Une rondelle de 6 mm de diamètre de papier Whatman n°3 ou n° 1, selon l'enzyme, est imbibée de l'extrait puis déposée contre la partie "anodique" du gel (Fig. 1e).

- Pour les feuilles adultes, le broyage se fait au mortier. Les rondelles de papier sont ensuite imbibées à travers une feuille de papier fin ou le broyat est pressé dans une seringue pour en extraire le maximum de liquide.

Dans ces conditions, il est possible de déposer, par plaque, une série de 10 à 12 échantillons à analyser plus 1 échantillon témoin (répété sur toutes les plaques) que l'on place au milieu.

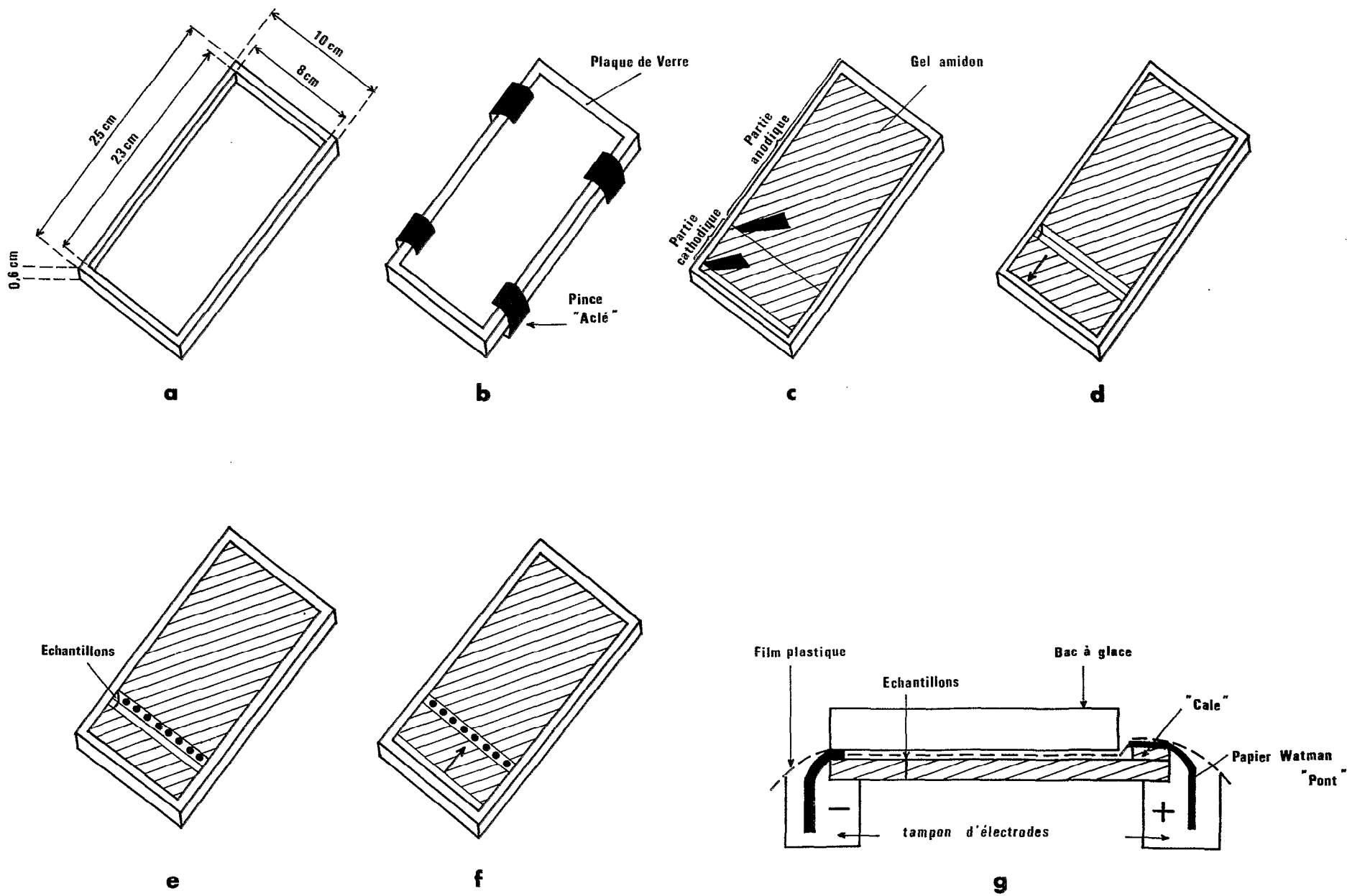


Fig. 1. **a**; Moule. en plastique. **b**; Gel durant le refroidissement. **c** et **d**; Préparation de la plaque pour l'insertion des échantillons. **e** et **f**; Insertion des échantillons. **g**; Coupe longitudinale de la plaque pour la migration.

Une demi rondelle de papier Whatman imbibée d'une solution de bleu de bromophénol (marqueur de migration) est déposée de part et d'autre, aux extrémités de la fente d'insertion des échantillons.

La partie cathodique du gel est repoussée contre la partie anodique en évitant les bulles d'air au niveau des papiers (Fig. 1f). La plaque est prête pour l'électrophorèse.

3°) MIGRATION

Elle est effectuée en chambre froide (8°C).

a) Mise en circuit de la plaque (Fig. 1g)

Le gel est connecté aux bacs d'électrodes par 2 épaisseurs de papier Whatman n°3 imbibés par capillarité de tampon "bac".

6 plaques peuvent être placées côte à côte sur les bacs.

750 ml de tampon sont placés dans chaque bac d'électrode. Après la migration, le tampon des deux bacs est mélangé et le pH est ajusté. Deux litres de tampon peuvent ainsi être utilisés pour la migration de 30 plaques environ (5 fois 6 plaques).

Une "cale" d'amidon de 2 cm de large sur 8 cm de long est placée à l'extrémité anodique du gel pour éviter l'échauffement et la cassure du gel à ce niveau au cours de l'électrophorèse.

Une feuille de parafilm évite la déshydratation du gel. Un bac rempli de glace évite l'échauffement au centre du gel et les distorsions de migration si l'intensité du courant électrique n'est pas trop importante.

b) Voltage, intensité et durée

Des générateurs à tension constante sont utilisés. Selon les tampons de migration, la différence entre le voltage affiché par le générateur et la différence de potentiel entre les extrémités des "ponts" de papier (voltage efficace) peut être importante.

Dans le cas d'un tampon Histidine-Citrate à pH 6,0 lorsque le voltage affiché est de 200 V le voltage efficace est de 150 V (8,5 V/cm environ). L'intensité par plaque se stabilise entre 15 et 20 mA après 45 mn d'électrophorèse.

Avec le tampon "Histidine-Citrate" à pH 8,0, l'intensité par plaque se stabilise entre 20 et 25 mA après 45 mn. Au-delà de 250 V affichés, il apparaît des distorsions importantes dans la migration des bandes.

Dans le cas d'un tampon "Borate de sodium", le voltage affiché est de 350 V pour un voltage efficace de 200 V (11 V/cm environ). L'intensité par plaque se stabilise entre 15 et 20 mA après 45 mn.

Dans ces conditions, la durée de migration doit être de 5 à 6 heures environ selon les enzymes.

Des migrations plus lentes, durant la nuit, peuvent être réalisées mais la diffusion des bandes est très importante.

4°) CHOIX DU SYSTEME EN FONCTION DE L'ENZYME REVELEE

Selon l'enzyme révélé, des modifications sont apportées sur les points suivants :

- Tampons de migration : nature et pH (Voir chapitre III)
- Organe et stade échantillonné
- Epaisseur de la rondelle de papier (support de l'extrait)
- Voltage efficace
- Temps de migration.

Le tableau récapitulatif 1 donne, dans le cas du riz, les combinaisons retenues pour 13 enzymes. Elles permettent la révélation de deux enzymes par plaque et de plusieurs enzymes avec le même extrait de broyage : on peut par exemple avec le même extrait de broyage révéler les EST et POX sur une plaque à pH 6,0 et un papier n° 3, les MDH et LAP sur une plaque à pH 6,0 et papier n° 1, les PGI, GDH et POX cathodiques sur une plaque à pH 8,0 et papier n°1.

Des détails complémentaires concernant le choix de l'organe analysé et son stade dans le cas du riz seront fournis avec la présentation des zymogrammes dans l'article suivant (Réf. citée).

TABLEAU 1 : CHOIX DU SYSTEME D'ELECTROPHORESE EN
 FONCTION DE TREIZE ENZYMES REVELEES (LDH exclues).

	Tampon d'électrophorese (1)			ORGANE ECHANTILLONNE						PAPIER (2) WHATMAN		MIGRATION	
	A	B	C	F1 Partie verte	F1 Partie blanche	F2-F3-F4	F _p	Gaine	Radicules	N° 3	N° 1	Voltage (V/cm)	Durée (H)
ADH	MR	BR		0	XX	0	0	0	/		+	8,5	6
GDH	MR	BR		XX	Artefact ?	X	X	X	Artefact ?		+	8,5	6
MDH	BR	MR		XX	XX	XX	XX	XX*	XX	+	+	8,5	6
ICD	MR	BR		X	XX	/	/	/	/		+	8,5	6
PGD	BR	BR		X	XX	X	X	X			+	8,5	6
CAT	MR	BR		0	XX	0	0	0	/		+	8,5	6
POX cathod.	BR	BR		XX	XX	X	X	X	X	+	+	8,5	5
Anodiq.	BR	BR		XX	0	X	X	X	X	+		8,5	5
GDT	BR	BR		X	0	XX	XX	X*	X		+	8,5	6
PGM	BR	BR		XX	X	X	X	X	/		+	8,5	6
EST	BR	BR		XX	X	X	X	X	X	+		8,5	5
PAC	MR	MR	BR	X	X	XX	XX	XX	/		+	11	5
LAP	BR	MR		XX	XX	X	X	X	/	+	+	8,5	6
PGI	BR	BR		XX	X	XX	X	X	XX		+	8,5	6

LEGENDE : E₁, partie verte : partie chlorophyllienne d'une jeune feuille en cours d'exertion.

E₁, partie blanche : Partie non exertée, extraite par traction, d'une jeune feuille en croissance.

F₂, F₃, F₄ : feuilles entièrement développées, de rang 2, 3 ou 4 en partant du sommet de la talle.

F_p : feuille paniculaire entièrement développée.

BR : bonne résolution - MR : mauvaise résolution. XX : forte activité, X : activité plus réduite, perte ou dédoublement de certaines bandes.

0 : pas d'activité

/ : pas essayé

* : recommandé en cas de distorsions des zymogrammes (avec *O. Longistaminata*).

Les cas soulignés sont conseillés.

(1) : Voir la composition des tampons au paragraphe III

(2) : Epaisseur de la rondelle de papier imbibée de l'extrait.

RÉVÉLATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

1°) GENERALITES

Après électrophorèse, la partie cathodique du gel est déplacée pour retirer les rondelles de papier. Le coin en haut et à droite de la plaque est coupé pour constituer un repère de position. Le gel est démoulé sur une plaque spéciale ayant des rebords de 3 mm d'épaisseur puis il est coupé en deux tranches à l'aide d'un fil à pêche (0,5 K) appliqué sur les rebords de la plaque utilisés comme guides.

La première partie du gel est retournée dans un bac pour une révélation.

La deuxième partie du gel est glissée dans un autre bac pour une deuxième révélation.

Les révélations enzymatiques apparaissent sur les faces internes du gel.

La tranche inférieure du gel donne généralement une meilleure résolution.

Le principe des colorations utilisées peut être trouvé dans HARRIS and HOPKINSON (1976).

2°) REVELATION A L'AGAR

Pour certaines révélations - PGM, PGI etc... La coloration apparaît dans la solution de révélation à la surface du gel mais très faiblement dans son épaisseur.

Il est donc nécessaire d'utiliser la méthode de révélation à l'agar :

I. Dans un erlenmeyer de 250 ml peser 1 g. d'Agar-Agar. Dissoudre dans 50 ml H₂O. Porter à ébullition tout en agitant. Maintenir à l'étuve à 45-50°C jusqu'à l'emploi (préparer 30 mn avant emploi).

II. Dans un autre erlenmeyer de 150 ml préparer le mélange réactionnel. (Substrat, NAD ... etc.) pour 100 ml. Ajouter 50 ml de tampon.

Juste avant la révélation, mélanger les solutions I et II. Verser sur le gel en évitant les bulles d'air. Laisser gélifier et mettre à l'étuve à 40°C.

3°) FIXATION ET CONSERVATION DES PLAQUES

Après la révélation, la coloration des plaques d'amidon ou d'agar est fixée dans l'acide acétique à 7,5% pendant une nuit. Après photographie éventuelle, les plaques sont alors placées dans un sachet de polyéthylène scellé. Elles peuvent ainsi être conservées indéfiniment à l'obscurité mais certaines colorations disparaissent à la longue (PGI, MDH ...).

4°) PROCEDES DE REVELATION PAR ENZYME

Les recettes de révélation utilisées sont généralement peu modifiées des données bibliographiques. Elles sont indiquées après le rappel de la réaction enzymatique utilisée.

Les tampons de révélation et certaines solutions (NBT, PMS, Naphtyl acétate etc...) sont préparés à l'avance. Lorsque leur composition n'est pas indiquée dans le texte suivant, les chiffres entre parenthèses renvoient à la liste des solutions de révélation du chapitre III.

ALCOOL DESHYDROGENASE (ADH)

Alcool + NAD ADH → Aldéhyde + NADH

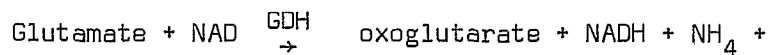
Révélation : BREWER (1970) modifiée

NAD (DPN)	25	mg
Tampon Tris 0,5 M pH 8,5 (2)	10	ml
Alcool Absolu	0,5	ml
H ₂ O	75,5	ml
NBT 10mg/ml	2	ml
PMS 1mg/ml		
Incuber à 40°C pendant 1 heure	2	ml
Rincer et fixer.		

Remarque :

Il est recommandé de ne pas révéler dans la même étuve les ADH et d'autres déshydrogénases : il y a transfert de l'alcool d'une plaque sur l'autre et révélation des ADH sur toutes les plaques.

GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH)



Révélation : BREWER (1970) modifiée

Glutamate de Na, H ₂ O	500 mg
NAD	50 mg
Tris HCl 0,5 M pH 8,5 (2)	20 ml
H ₂ O	76 ml
NBT 10 mg/ml	2 ml
PMS 1 mg/ml	2 ml

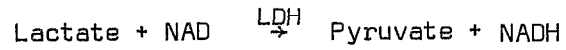
Incuber au moins 3 heures à 40°C. Il faut compter 1 heure avant l'apparition des bandes.

Rincer et fixer.

Remarques :

Le stade de prélèvement adéquat semble assez limité avec les feuilles de riz. La partie verte d'une feuille très jeune convient le mieux. Si la feuille est trop âgée, il y a disparition des bandes.

LACTATE DESHYDROGENASE (LDH)



Révélation : BREWER (1970) modifiée

Lactate de Lithium 1 M dans H ₂ O	25 ml
NAD	25 mg
Tampon Tris HCl 0,5 M pH 8,5 (2)	20 ml
H ₂ O	76 ml
NBT 10 mg/ml	2 ml
PMS 1 mg/ml	2 ml

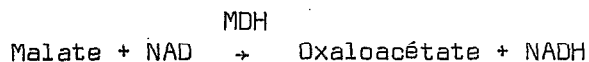
Incuber à 40°C pendant 1 heure.

Rincer et fixer.

Remarque :

Les zymogrammes observés sont très variables avec l'organe et le stade utilisé.

MALATE DESHYDROGENASE (MDH)



Révélation : SHAW et PRASAD (1970) modifiée

NAD	25 mg
Malate 1 m pH 6,0 (11)	10 ml
Tampon Tris HCl 0,5 M pH 8,5 (2)	20 ml
H ₂ O	66 ml
NBT 10 mg/ml	2 ml
PMS 1 mg/ml	2 ml

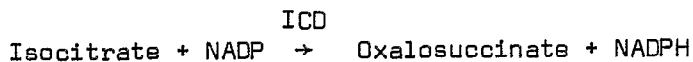
Incuber 1 heure à 40°C à l'obscurité.

Rincer, fixer.

Remarques :

Les zymogrammes de MDH sont particulièrement stables quelque soit le stade et l'organe analysé en ce qui concerne le nombre de bandes révélées. Cependant, avec des extraits de limbes de feuilles, la vitesse de migration des bandes est très variable (particulièrement dans l'espèce *O. longistaminata*) selon la plante et le stade de la feuille, pour des raisons qui semblent indépendantes de la structure primaire des protéines. (en effet, les bandes d'un mélange de deux extraits migrent à une distance intermédiaire de celles des extraits séparés). Ce phénomène qui conduit à des distorsions gênantes (voir photo) est évité en utilisant des gaines de feuilles adultes ou des parties non exécutées de feuilles en croissance.

ISOCITRATE DESHYDROGENASE (ICD)



Révélation : BREWER (1970) modifiée

Isocitrate de sodium tri-Na	200 mg
NADP (TPN)	20 mg
Mg Cl ₂ 0,4 M	1 ml
Tampon Tris HCl 0,5 M pH 8,5 (2)	20 ml
H ₂ O	75 ml
NBT 10 mg/ml	2 ml
PMS 1 mg/ml	2 ml

Incuber à 40°C à l'obscurité.

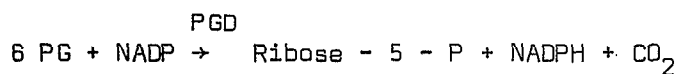
Rincer et fixer.

Remarques

1°) Il est possible de révéler l'ICD en remplaçant
Mg Cl₂ par MnCl₂

2°) Utiliser la partie non exertée d'une jeune feuille.

6 PHOSPHO-GLUCONATE DESHYDROGENASE (PGD)



Révélation : BREWER (1970) modifiée

Phosphogluconate de sodium	20 mg
Mg Cl ₂ 0,4 M	1 ml
NADP (TPN)	10 mg
Tris HCl 0,5 M pH 8,5 (2)	20 ml
H ₂ O	75 ml
NBT 10 mg/ml	2 ml
PMS 1 mg/ml	2 ml

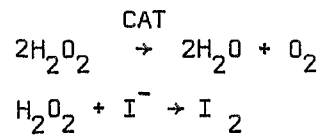
Incuber à 40°C.

Rincer et fixer.

Remarques

- 1°) La résolution n'est pas toujours bonne avec le riz mais excellente avec *Panicum maximum*.
- 2°) Il y a un resserement des bandes rapides à pH 6,0 qui ne permet pas de différencier autant de zymogrammes qu'à pH 8,0.
- 3°) Des isozymes secondaires apparaissent entre les bandes principales. Ils sont réduits par utilisation de la partie non exercée d'une jeune feuille et par adjonction de NADP aux tampons de gel et de migration.

CATALASE (CAT)



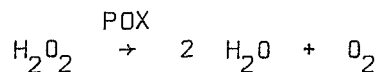
Révélation : BREWER (1970)

Mélanger 30 ml d'une solution 0,06 M de Thiosulfate (5) et 70 ml d'une solution H_2O_2 à 1% (7)
Verser sur le gel et attendre 2 minutes.
Rincer abondamment à l'eau
Ajouter la solution 0,09 M IK (6)
Les bandes apparaissent en blanc sur fond bleu
Photographier immédiatement ou noter.

Remarques

- 1°) Les catalases se révèlent avec des extraits de partie non exertée d'une jeune feuille. Il n'y a aucune activité avec des extraits de partie chlorophyllienne.
- 2°) Avec une migration à pH 6,0, la résolution est très mauvaise.

PEROXYDASES (POX)



L'oxygène libéré oxyde un composé qui se colore.

Révélation : SHAW et PRASAD

3-Amino-9-Ethyl Carbazole	40 mg
Diméthyl formamide	5 ml
Tampon Acétate 0,05 M pH 5,0 (1)	92,5 ml
Solution de Ca Cl ₂ 0,1 M	2,0 ml
Solution de H ₂ O ₂ à 30 %	30 µl
Incuber 30 à 60 minutes.	
Rincer, fixer.	

Remarques

- 1°) Le polymorphisme des peroxydases est très sensible au stade de développement de la plante et à l'organe. Dans le cas du riz, les bandes anodiques rapides apparaissent nettement avec les parties vertes des feuilles développées alors qu'elles disparaissent pratiquement dans les parties blanches de feuilles en croissance extraites. Par contre, en ce qui concerne les bandes cathodiques, les résolutions sont meilleures avec des extraits de parties blanches de feuilles de jeunes plantules.
- 2°) Les zymmogrammes diffèrent suivant la révélation utilisée (Benzidine, Galacol, O. Dianisidine, Amino-Ethyl Carbazote etc...).

GLUTAMATE OXALOACETATE TRANSAMINASE (GOT)

GOT

L. Aspartate + Ketoglutarate → L Glutamate +
Oxaloacetate + Fast Blue BB Salt → Coloration verte

Révélation : SHAW et PRASAD (1970) modifiée

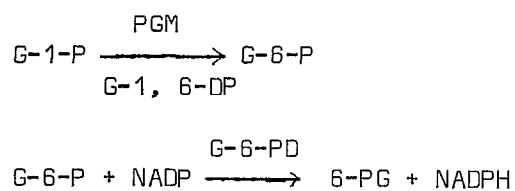
Acide aspartique	400 mg
Acide ketoglutarique	200 mg
Tris HCl 0,5 M pH 8,5 (2)	45 ml
H ₂ O	55 ml
Pyridoxal 5' Phosphate	2 mg
Fast Blue BB Salt	400 mg

Le pH doit être obligatoirement compris entre 7,8 et 8,0. Il faut surveiller la révélation. La solution devient marron et le gel se colore en rouge brun. Les bandes apparaissent en vert.

Remarque :

Les GOT se révèlent avec des extraits de feuilles entièrement développées, au mieux à pH 6,0 : les bandes rapides (B et C) sont bien séparées. La distorsion des zymogrammes observée pour les MDH avec des extraits de limbe de feuille se retrouve ici, particulièrement pour la bande lente (A), avec l'espèce *O. longistaminata*. L'utilisation d'extraits de gaines de feuilles ou de parties non exercées de feuilles en croissance résoud ce problème mais la bande de mobilité intermédiaire (B) est alors absente.

PHOSPHOGLUCOMUTASE (PGM)



Révélation : BREWER (1970) modifiée

Glucose 1 phosphate (contenant du 1-6 Diphosphate)	100 mg
Mg Cl ₂ 0,4 M	1 ml
NADP	10 mg
Tampon Tris HCl 0,5 M pH 8,5 (2)	47 ml
NBT 10 mg/ml	2 ml
PMS 1 mg/ml	2 ml
Glucose 6. phosphate déshydrogénase	0,05 ml

Ajouter la G.6.PD immédiatement avant la révélation puis mélanger à 500 ml d'agar (8). Incuber à 40°C à l'obscurité. Après révélation, retirer la plaque d'agar et fixer.

ESTERASES (EST)

EST

Un ester carboxylique + H₂O → un alcool + un anion acide carboxylique

Révélation : SCANDALIOS (1969) modifiée

Fast Blue RR Salt 100 mg

Tampon Phosphate 0,1 M pH 7,1 (10) 97 ml

Bien dissoudre avec un agitateur magnétique.

Ajouter : α Naphthyl Acétate à 2% dans l'acétone 1,5 ml

β Naphthyl Acétate à 2% dans l'acétone 1,5 ml

Incuber 3 heures à température ambiante, de préférence à l'obscurité.

Rincer abondamment et fixer.

Remarques

1°) Le tampon Tris généralement utilisé dans la révélation des estérases sur gel d'acrylamide, ne convient absolument pas sur gel d'amidon et tampon Histidine.

2°) La bande cathodique rapide est nettement plus visible dans le système de migration préconisé par BREWER (1970). Il n'en est pas de même pour les bandes anodiques.

PHOSPHATASE ACIDE (PAC)

PAC

α Naphtyl phosphate \rightarrow α Naphtol + Acétate

Révélation : PAI, ENDO et OKA (1975)

α Naphthyl acid Phosphate	50 mg
Fast Garnet GBC	50 mg
Tampon Acétate de Na 0,05 M pH 5,0 (1)	100 ml

Incuber au moins 3 heures à 40°C.

Rincer et fixer.

Remarques

- 1°) Les phosphatases acides ne se révèlent que sur des feuilles très âgées ou sur feuilles paniculaires. Avec la gaine des feuilles paniculaires la bande Fa (Réf. ci-dessus) apparaît très nettement.
- 2°) Les bandes "AMC" cathodiques n'apparaissent pas toujours très nettement.

LEUCINE AMINOPEPTIDASE (LAP)

LAP

L. leucyl β Naphtylamide HCl \rightarrow Naphtylamine

Révélation : SHAW et PRASAD (1970)

L. leucyl β Naphtylamide HCl	50 mg
H ₂ O	30 ml
Fast Black K Salt	50 mg
Tris Maléate 0,2 M pH 3,3 (3)	50 ml
NaOH 0,2 M (4)	20 ml

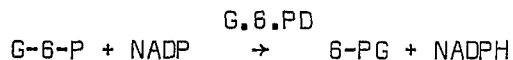
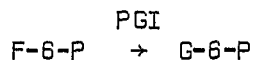
Incuber 2 à 3 heures à 40°C.

Rincer et fixer.

Remarques

- 1°) La L. leucyl β Naphthylamide est très cancérigène.
La solution de révélation doit être manipulée avec précautions.
- 2°) La comparaison des bandes de migration très voisines doit être effectuée sur des zymogrammes placés côte à côte sur la même plaque.

PHOSPHO-GLUCOSE ISOMERASE (PGI)



Révélation : BREWER (1970) modifiée

Fructose 6 Phosphate	100 mg
Mg Cl ₂ 0,4 M	1 ml
NADP (TPN)	10 mg
Tampon Tris 0,5 M pH 8,5	47 ml
NBT 10 mg/ml	2 ml
PMS 1 mg/ml	2 ml
Glucose 6. Phosphate déshydrogénase	0,05 ml

Ajouter la G-6.PD immédiatement avant la révélation pour éviter le brunissement de la solution. Mélanger à 50 ml d'agar à 2% (8) et verser sur le gel. Chasser les bulles d'air. Mettre à l'étuve à 40°C.

Après révélation, retirer la plaque d'agar et fixer.

Remarque

Avec des extraits de jeunes feuilles, la révélation d'isozymes secondaires est plus prononcée et dédouble les bandes. Ceci est évité avec des extraits de feuilles âgées, de coléoptiles ou de racines séminales.

COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISÉES

Le tableau 2 indique les références des principaux produits chimiques utilisés.

1°) TAMPONS DE MIGRATION

Système A - Système de BREWER (1970) légèrement modifié. Utilisé avec des gels à 14 g. d'amidon pour 100 ml de tampon.

Tampon "Gel". Histidine HCl 5 mM, NaCl 2,5 mM pH 6,0

Histidine mono HCl	1,92 g
Na Cl M	5 ml

Ajuster à pH 6,0 avec NaOH 2 N et compléter à 200 ml avec H₂O.

Tampon "Bac". Citrate de Na 0,41 M, pH 6,0

Acide citrique	172 g
NaOH en pastilles	86 g
H ₂ O	1.800 ml

Ajuster à pH 6,0 avec NaOH concentrée et compléter à 2.000 ml avec H₂O.

Système B - Système de BREWER (1970) légèrement modifié Utilisé avec des gels à 14 g. d'amidon pour 100 ml de tampon.

Tampon "Gel". Histidine HCl 5 mM, NaCl 2,5 mM pH 8,0.

Histidine HCl	1,92 g
Na Cl M	5 ml

Ajuster à pH 8,0 avec NaOH 2N et compléter à 2.000 ml avec H₂O.

Tampon "Bac". Citrate de Na 0,41 M pH 8,0

Acide citrique	172 g
NaOH en pastilles	88 g
H ₂ O distillée	1.800 ml

Ajuster à pH 8,0 avec une solution concentrée de NaOH et compléter à 2.000 avec H₂O.

Remarque : Selon la qualité de l'amidon il est nécessaire d'ajuster le pH du tampon "gel" pour que le mélange amidon + tampon soit au pH correct ; Dans notre cas on ajuste à 6,25 pour 6,0 et 9,2 pour 8,0.

Système C - Système de SMITHIES (1955). Utilisé avec des gels à 11 g. d'amidon pour 100 ml de tampon.

Tampon "Gel". Borate 0,03 M pH 8,5

Acide borique	3,72 g
H ₂ O	1.800 ml

Ajuster à pH 8,5 avec Na OH 2N et compléter à 2.000 ml avec H₂O.

Tampon "Bac". Borate 0,3 M pH 8,0

Acide borique	37,2 g
H ₂ O distillée	1.800 ml

Ajuster à pH 8,0 avec NaOH concentrée et compléter à 2.000 ml avec H₂O.

2°) SOLUTIONS DE REVELATION

1. Tampon Acétate de Na 0,05 M pH 5,0

Acétate de Na, 3H ₂ O	13,6 g
H ₂ O	1.900 ml

Ajuster à pH 5,0 avec HCl normal. Compléter à 2.000 ml avec H₂O.

2. Tampon Tris HCl 0,5 M pH 8,5

Tris (Hydroxyméthyl) amino-méthane	121 g
H ₂ O	1.900 ml

Ajuster à pH 8,5 avec HCl 1/2 concentré. Compléter à 2.000 ml avec H₂O.

3. Tampon Tris-Maléate 0,2 M pH 3,3

Tris	24,2 g
Acide maléique	23,2 g
H ₂ O	q.s.p. 1.000 ml

4. Tampon NaOH 0,2 M

NaOH pastilles	8,0 g
H ₂ O	q.s.p. 1.000 ml

5. Solution Thiosulfate de Na 0,06 M

Thiosulfate de Na, 5 H ₂ O	1,5 g
H ₂ O	q.s.p. 1.000 ml

6. Solution Iodure de K 0,09 M

Iodure de K	1,5 g
H ₂ O	q.s.p. 1.000 ml

7. Solution H₂O₂ à 1%

H ₂ O ₂ MERCK à 30%	3,3 ml
H ₂ O	q.s.p. 100 ml

8. Solution d'Agar à 2%

Peser 1 g. d'Agar-Agar dans 50 ml H₂O. Porter à ébullition tout en agitant, maintenir à 45-50°C jusqu'à l'emploi.

9. Tampon Phosphate de Na 0,1 M pH 6,5

a) NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	27,6 g dans 1 l H ₂ O
--	----------------------------------

b) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 71,2 g dans 2 l H_2O

Mélanger a et b de façon à obtenir le pH 6,5

Diluer au 1/2 avec H_2O

10. Tampon Phosphate 0,1 M pH 7,1

Solution de Phosphate 0,2 M

a) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27,6 g dans 1 l H_2O

b) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 71,2 g dans 2 l H_2O

Mélanger 300 ml de solution a + 600 ml solution b +
900 ml H_2O

11. Tampon Malate de Na 1 M pH 6,0

a) Acide Di malique : 26,8 g + H_2O q.s.p. 100 ml

b) $\text{Na}_2 \text{CO}_3$: 21,2 g + q.s.p. 100 ml

Ajouter doucement b dans a tout en agitant fortement
avec un agitateur magnétique. Le pH est environ 7,0.

Produits	Abreviation chimique	P.M	Fournisseur	Référence
3 Amino-9-ethyl carbazole	/		SIGMA	A 5754
DL Aspartic Acid	/	133,1	SIGMA	A 9006
Sodium L(+)-glutamate	/		MERCK	6445
N-N Diméthyl formamide	/	73,1	MERCK	3034
DL-Malic acid	/	134,1	MERCK	382
Fast Blue BB Salt	/	416,0	SIGMA	F 3378
Fast Blue RR Salt	/	/	SIGMA	F 0500
Fast Black K Salt	/	/	SIGMA	F 7253
Fast Garnet GBC	/	334,4	SIGMA	F 0875
Fructose 6 Phosphate	F-6-P	304,1	SIGMA	F 3627
Glucose-1-Phosphate	G-1-P	304,1	SIGMA	G 7000
Glucose-6-Phosphate	G-6-P	282,1	SIGMA	G 7879
Glucose 6 Phosphate dehydrogénase	G-6-PD	400 Units/mg	SIGMA	G 8878
Histidine Hydrochloride	/	191,7	SIGMA	H 8125
(Hydroxyméthyl) Amino-méthane	Tris	121,1	SIGMA	T 1503
DL Isocitric Acid	/	258,1	SIGMA	I 1252
Kétoglutaric Acid	/	146,1	SIGMA	K 1750
L.Leucyl β Naphthylamide HCl	/	292,8	SIGMA	L 0376
α Naphtyl Acetate	/	186,2	SIGMA	N 6750
β Naphtyl Acetate	/	186,2	SIGMA	N 6875
α Naphtyl Acid Phosphate	/	246,1	SIGMA	N 7000
β Nicotinamide Adenine Dinucléotide phosphate	NADP (TPN)	765,4	SIGMA	N 0505
β Nicotinamide Adenine Dinucléotide	NAD (DPN)	663,5	SIGMA	N 7004
Nitroblue Tetrazolium	NBT	817,7	SIGMA	N 6876
Phénazine metosulfate	PMS	306,4	SIGMA	P 9625
6. Phosphogluconic Acid	/	342,1	SIGMA	P 7877
Pyridoxal 5' phosphate	/	247,2	SIGMA	P 9255

TABLEAU 2 : REFERENCE DES PRINCIPAUX PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

TECHNIQUE DE DÉNATURATION A LA CHALEUR DES ISOZYMES

Des aliquots du même extrait de broyage sont placés sur 4 à 6 plaques différentes. Après électrophorèse, les gels sont parqués en deux. Seules les demies plaques inférieures sont introduites dans des sacs de polyéthylène puis plongées dans une gamme (4 à 6) de bain marie à des intervalles de température de 3°C (entre 40° et 80° C selon les enzymes) pendant 20 minutes. Les plaques sont ensuite refroidies dans de l'eau à température ambiante puis révélées à la manière habituelle. Des essais ont montré que l'emploi de durées plus courtes ou une durée variable à la même température donnent des résultats moins répétables.

Lorsque les révélations sont effectuées dans l'agar, les deux demies plaques donnant des intensités de coloration identiques peuvent être indifféremment utilisées.

Des différences répétables de stabilité des isozymes peuvent être mises en évidence en utilisant des intervalles de température encore plus réduits (1 à 2°C).

L'étude de la thermostabilité des isozymes est facilitée par l'utilisation de lignées pures ou de plantes autogames chez lesquelles les hétérozygotes sont rares ou absents.

La figure 2 indique les gammes de température à utiliser pour les différentes enzymes étudiées. On notera que les GDH n'ont pas perdu leur activité après 20 minutes à 80°C (température maximum supportée par le gel d'amidon).

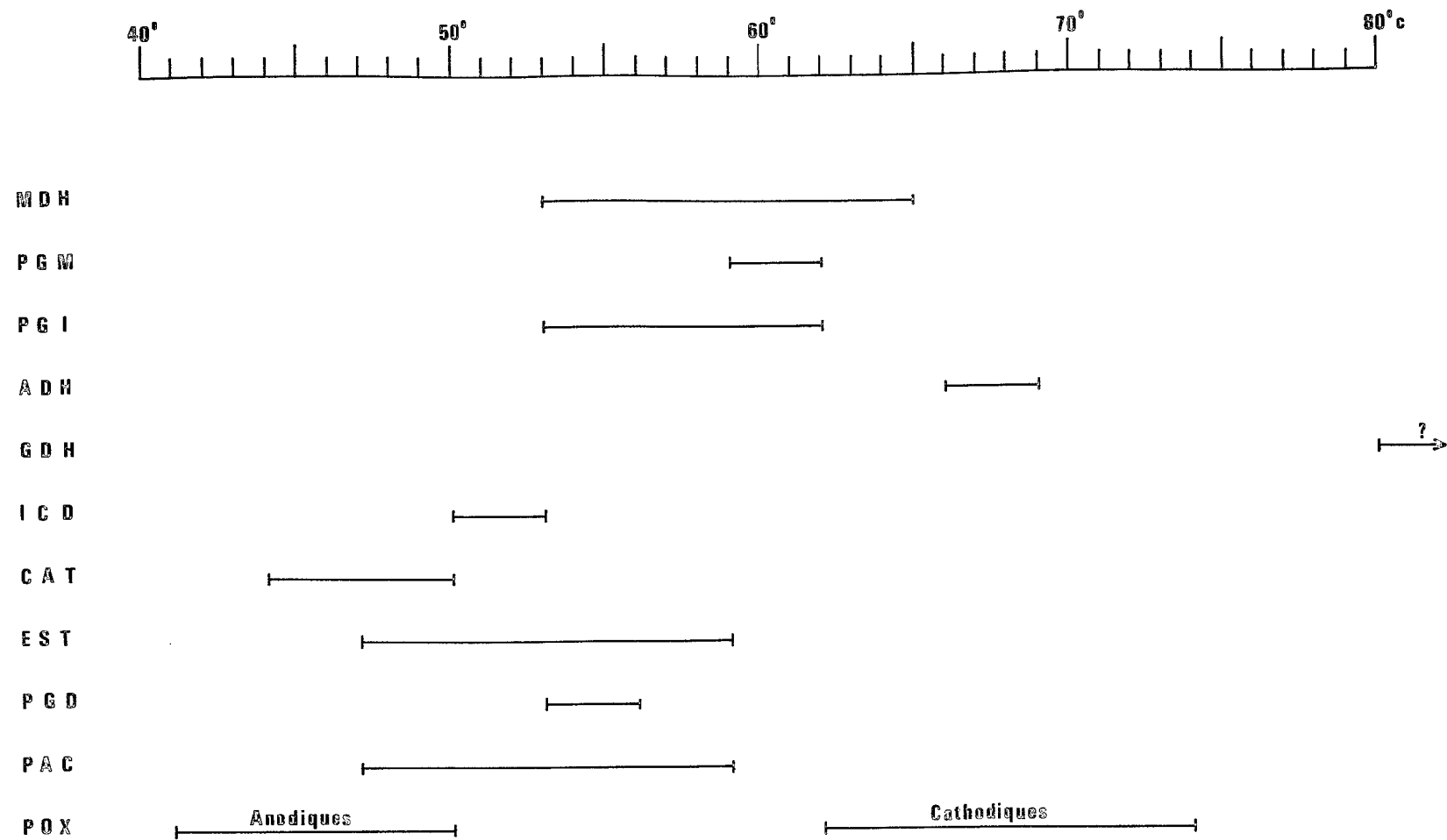


Fig. 2 Intervalles de température préconisés pour l'étude de la thermosensibilité des différents zymogrammes

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BREWER, G.J., 1970 - An introduction to isozymes techniques.
Academic Press. New York. San Francisco. London. 185 p.
- HARRIS, H. and D.A. HOPKINSON, 1976 - Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics.
North Holland publishing company, Inc., New York.
- 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.
- SCANDALIOS, J.G., 1969 - Genetics control of multiple molecular forms of enzymes in plants : A review.
Biochemical Genetics 3 : 37-79.
- SECOND, G. et P. TROUSLOT, 1980 - Polymorphisme de treize zymogrammes observés parmi diverses espèces sauvages et cultivées du genre *Oryza* - In : Electrophorèse d'enzymes de riz (*Oryza sp.*) - Travaux et Documents de l'ORSTOM - N° 120.
- SHAW, C.R. and PRASAD, R., 1970 - Starch gel electrophoresis of enzymes, a compilation of recipes.
Biochemical Genetics : 4 : 297-320.
- SMITHIES, O., 1955 - Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J. 61 : 629-641.
- TROUSLOT, P. et F. BERTHOU, 1980 - Technique d'électrophorèse en gel d'amidon appliquée à l'étude du polymorphisme enzymatique des caféiers : l'analyse en électrophorèse simultanée de huit enzymes - En préparation.

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

Les plaques d'amidon (ou d'agar dans le cas des PGI) sont photographiées après la révélation des zymogrammes. Le sens de migration est de bas en haut pour les parties anodiques et de haut en bas pour les parties cathodiques.

Légende : les zymogrammes (Z.) sont répertoriés de gauche à droite selon la numérotation des diagrammes de l'article suivant.

PLANCHE 1

- 1 : G D H : Z. 4 (4 fois) ; 5 ; 1 ; 4 ; 6 ; 4 (3 fois).
- 2 : M D H : Z. 21 ; 22 ; 3 ; 20 ; 3 ; 18 ; 21 ; 3 ; 18 ? ; 7.
- 3 : E S T (stade jeune feuille en croissance - Partie verte et partie blanche extraite mélangée).
 Z. B3 ; B3 ; B12 ; B3 ; B1 ; S20 ; *O. longistaminata* ;
 B12 ; B12 ; B3 ; B12.
- 4 : P G I : (stade du coléoptile)
 Z.12 ; 13 ; 10 ; 9 ; 8 ; 7 ; 5 ; 6 ; 4 ; 11 ; 3 ; 2.
- 5 : L A P : 2 plaques
 en haut : Z. 7 ; 6 ; 5 ; 10 ; 15 ; 16 ; 17 ; 19 ; 12 ; 2.
 en bas : Z.15 ; 20 ; 16 ; 16 ; 22 ; 23 ; 21 ; 20 ; 16 ;
 22.
- 6 : P G D : Zymogrammes variés sur 2 plaques.
- 7 : I C D : Z. 1 et 2.

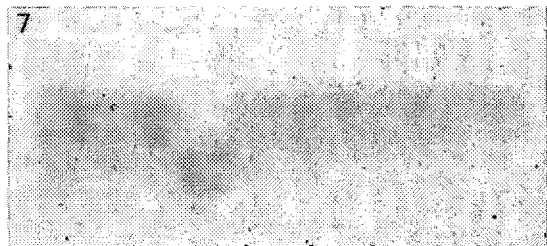
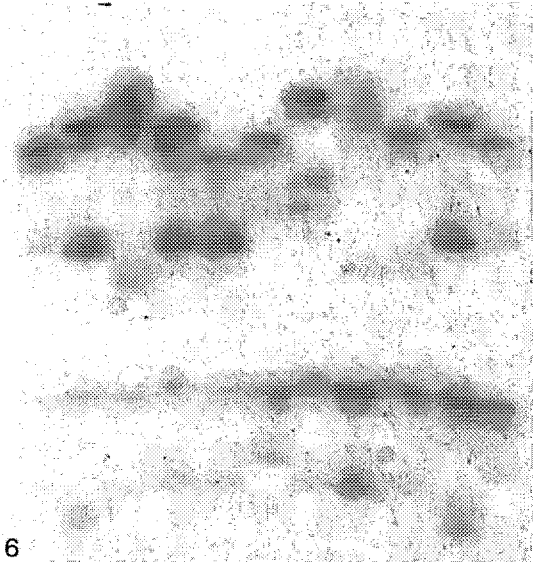
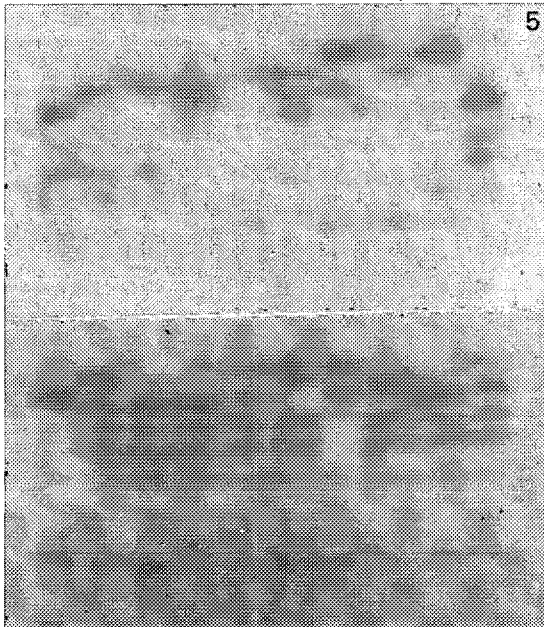
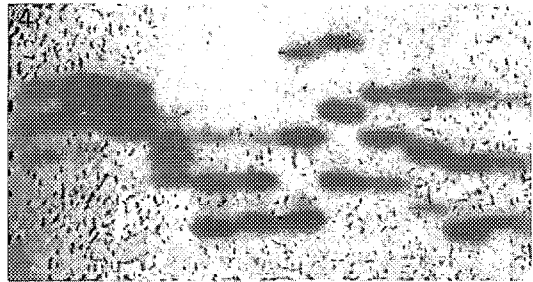
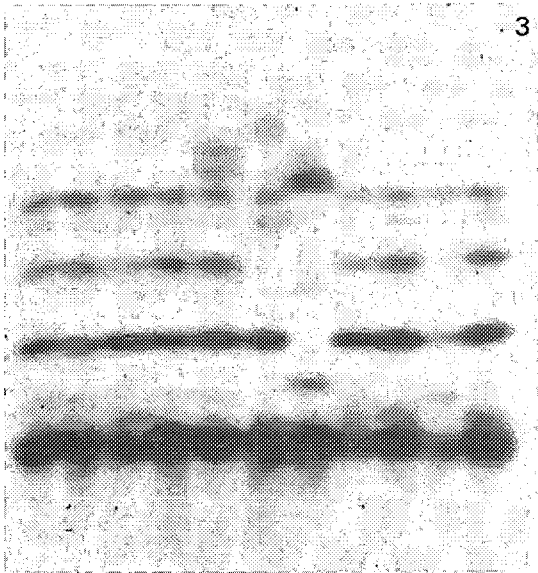
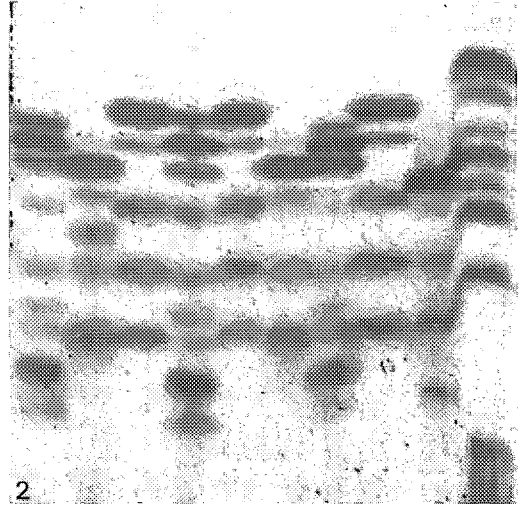
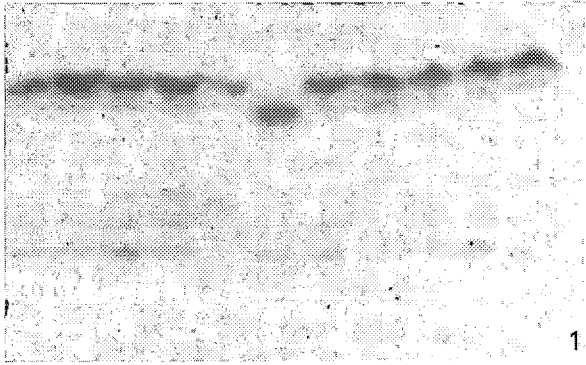


PLANCHE 2

1 : M D H (Extraits de gaines de feuilles)

Z : 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11.

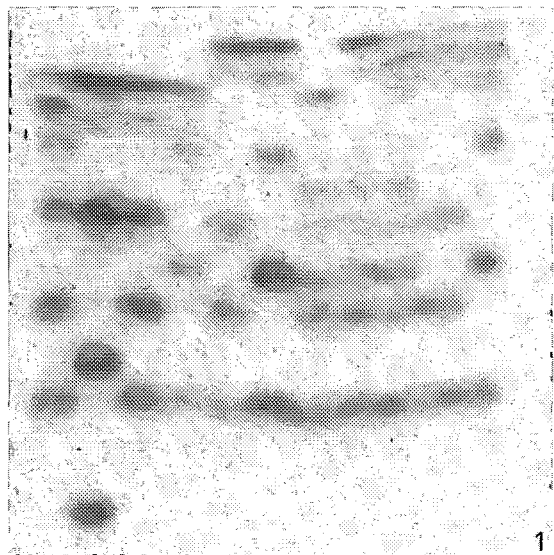
2 : M D H - Les mêmes plantes sont utilisées que pour la photo 1 mais avec des extraits de limbes de feuilles : les mêmes zymogrammes sont observés avec des différences de Rf dans la migration des bandes qui conduisent à des distorsions. Les bandes homologues sont cependant "pontées" entre zymogrammes voisins.

3 : G O T : Zymogrammes variés sur 2 plaques.

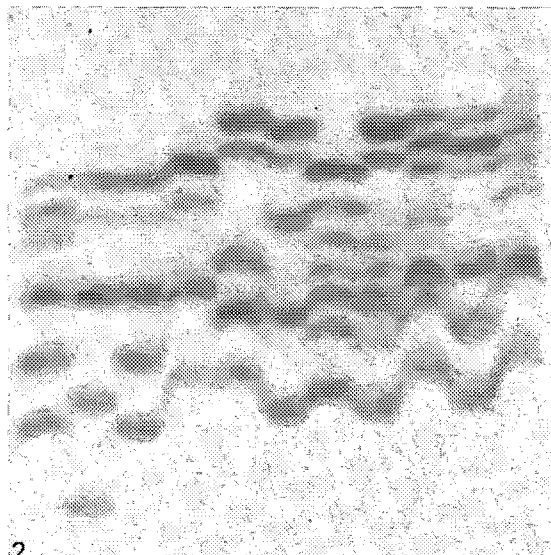
4 : C A T : Zymogrammes 1, 2 et 3.

5 : P O X : Partie anodique - Bandes D, E1 et E2.

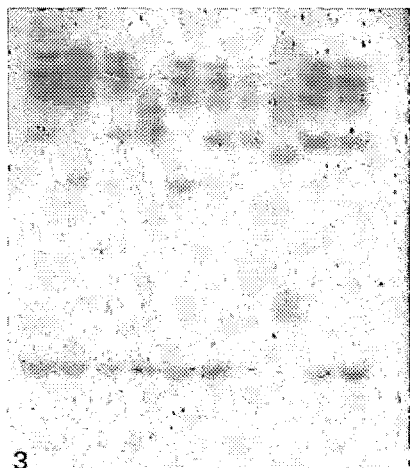
6 : E S T : Bande cathodique Ca - Système préconisé par BREWER (1970) pour les estérases.



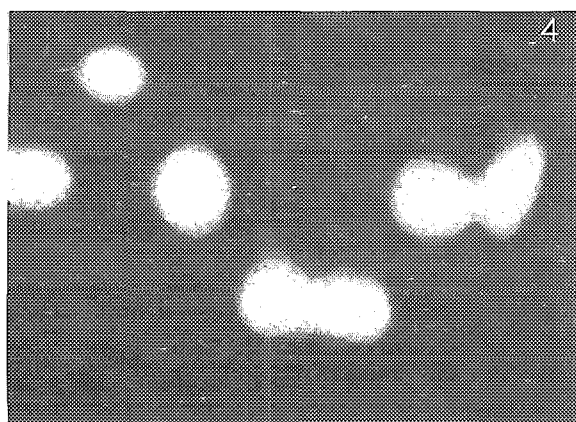
1



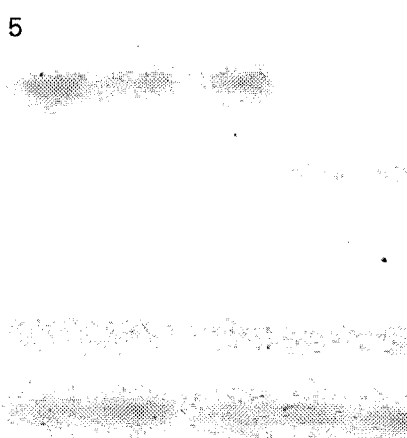
2



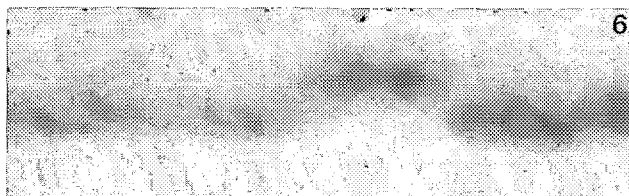
3



4



5



6

PLANCHE 3

1 : P G I - 4 plaques, portant les mêmes extraits de jeunes germes, révélées après un traitement thermique de 20 mm à 50, 53, 56 et 59°C (respectivement de bas en haut).

La nomenclature des bandes est la suivante, de gauche à droite :

Bande supérieure :

B₁ 59 ; B₂ 56 ; B₁ 56 (7 fois) ; B₄ 56 ; B₄ 53 ; B₁ 56.

Bande inférieure :

A₅ 56 ; A₁ 59 ; A₁ 59 ; A₂ 59 ; A₃ 59 ; A₁ 56 ; A₁ 53 ; A₁ 50 ;
A₂ 59 ; A₂ 53 ; A₃ 59 ; A₄ 59.

2 : E S T - (Stade Jeune feuille, partie verte seulement).

S28 ; S17 ; S21 ; S24 ; S26 ; B1 ; S14 ; S21 ; S1 ; S7 ; S22.

N.B. : Sur les Z. S28 et S24, la bande J2 est très faible mais présente. Elle apparaîtrait plus nettement avec des extraits de feuilles plus âgées. De même sur le Z. B₁, la bande F₁ est absente car des extraits de feuillés verts sont utilisés.

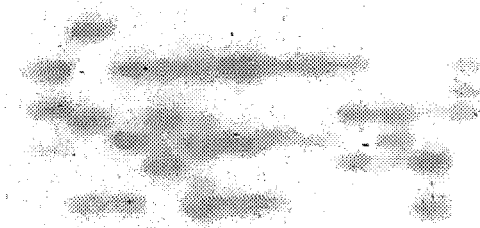
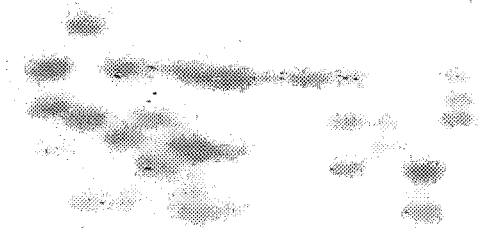
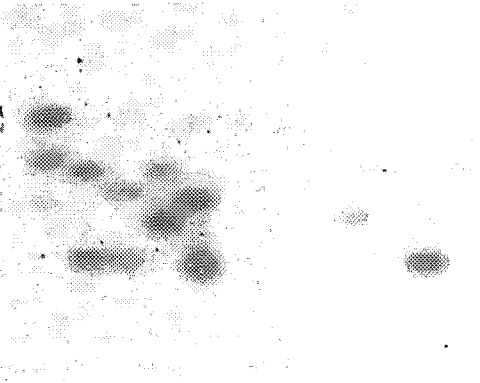
3 : Moitié gauche : P G I

Moitié droite : M D H - Z. 19 ; 18 ; 20 ; 19 ; 3

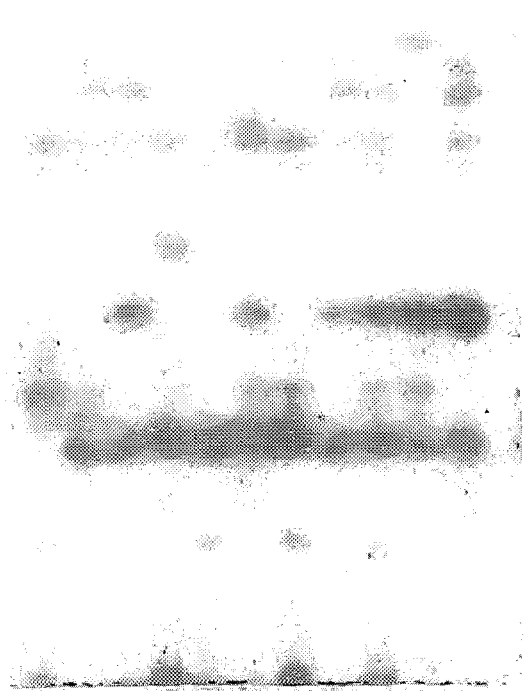
De gauche à droite, les espèces représentées sont les suivantes : *Oryza punctata*, 2n, *O. eichingeri*, *O. punctata* 4n, *O. punctata* 2n, *O. glaberrima*.

On remarque que pour les P G I, comme pour les M D H, le zymogramme de l'espèce tétraploïde est hybride entre ceux des espèces diploïdes parentales.

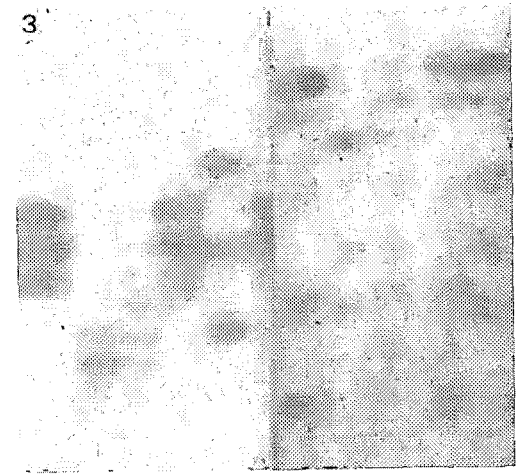
4 : M D H - 3 plaques, portant les mêmes extraits de feuilles, révélées après un traitement thermique de 20 mm à 56, 59 et 62°C, respectivement de gauche à droite.



1

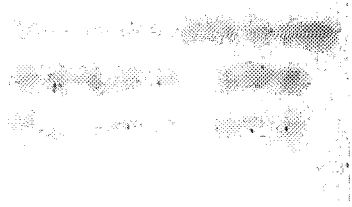
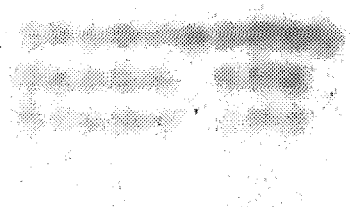
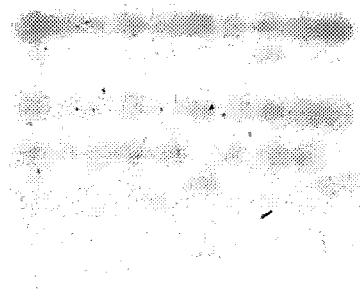


2



3

4



**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 "parenté" 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 exertée et partie blanche non exertée 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 :

1°) germination, 2°) entre le repiquage et le stade du tallage (jeune plantule),

3°) stade du tallage, 4°) stade de la floraison.

4°) ELECTROPHORESE

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

5°) SUCCESSION 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 "F₁" 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 F₃ ou F₄ 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 ₁	A ₂	A ₁ /A ₂	χ ²	A ₁	A ₂	
	G	A ₁ /A ₁	A ₂ /A ₂	A ₁ /A ₂				
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 ₁	B ₂	B ₁ /B ₂	χ ²	B ₁	B ₂	
	G	B ₁ /B ₁	B ₂ /B ₂	B ₁ /B ₂				
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 ₁	C ₂	C ₁ /C ₂	χ ²	C ₁	C ₂	
	G	C ₁ /C ₁	C ₂ /C ₂	C ₁ /C ₂				
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 - Estérases "E"

Population		Phénotype (P) et Génotype (G)				Fréquence des types alléliques				
	n	P	E ₄	E ₅	E ₄ /E ₅	χ ²	E ⁻	E ₄	E ₅	
		G	E ⁻ /E ⁻	E ₄ /-	E ₅ /-	E ₄ /E ₅				
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 ₄	E ₅	E ₆	E ₄ /E ₅	E ₄ /E ₆	E ₅ /E ₆	E ₄	E ₅	E ₆	
		G	E ₄ /E ₄	E ₅ /E ₅	E ₆ /E ₆	E ₄ /E ₅	E ₄ /E ₆	E ₅ /E ₆				
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 χ^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.

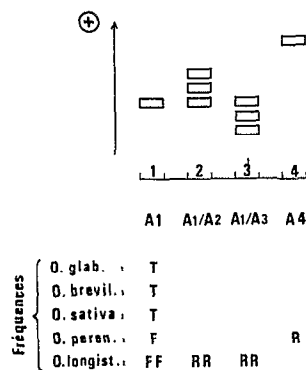
RÉSULTATS

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 révélé 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 (A₁/A₄).

Alcool Deshydrogénases



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.

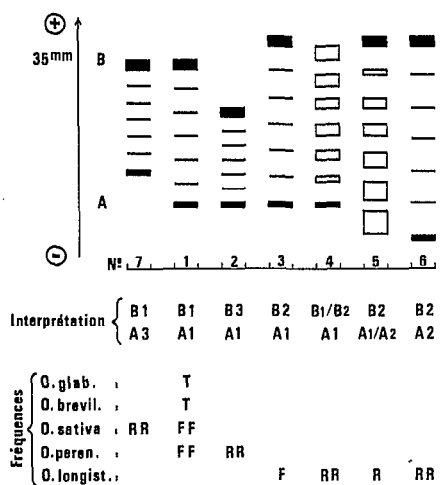
Type d'hexamère :	Nombre de bandes et leur concentration chez l'homozygote $A_1 A_1 B_1$ (Z. 1)	Nombre de bandes correspondantes chez l'hétérozygote $A_1 A_2 B_2$ (Z. 5)
B B B B B B	1 : 1/64	1
B B B B B A	1 : 6/64	2
B B B B A A	1 : 15/64	3
B B B A A A	1 : 20/64	4
B B A A A A	1 : 15/64	5
B A A A A A	1 : 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).

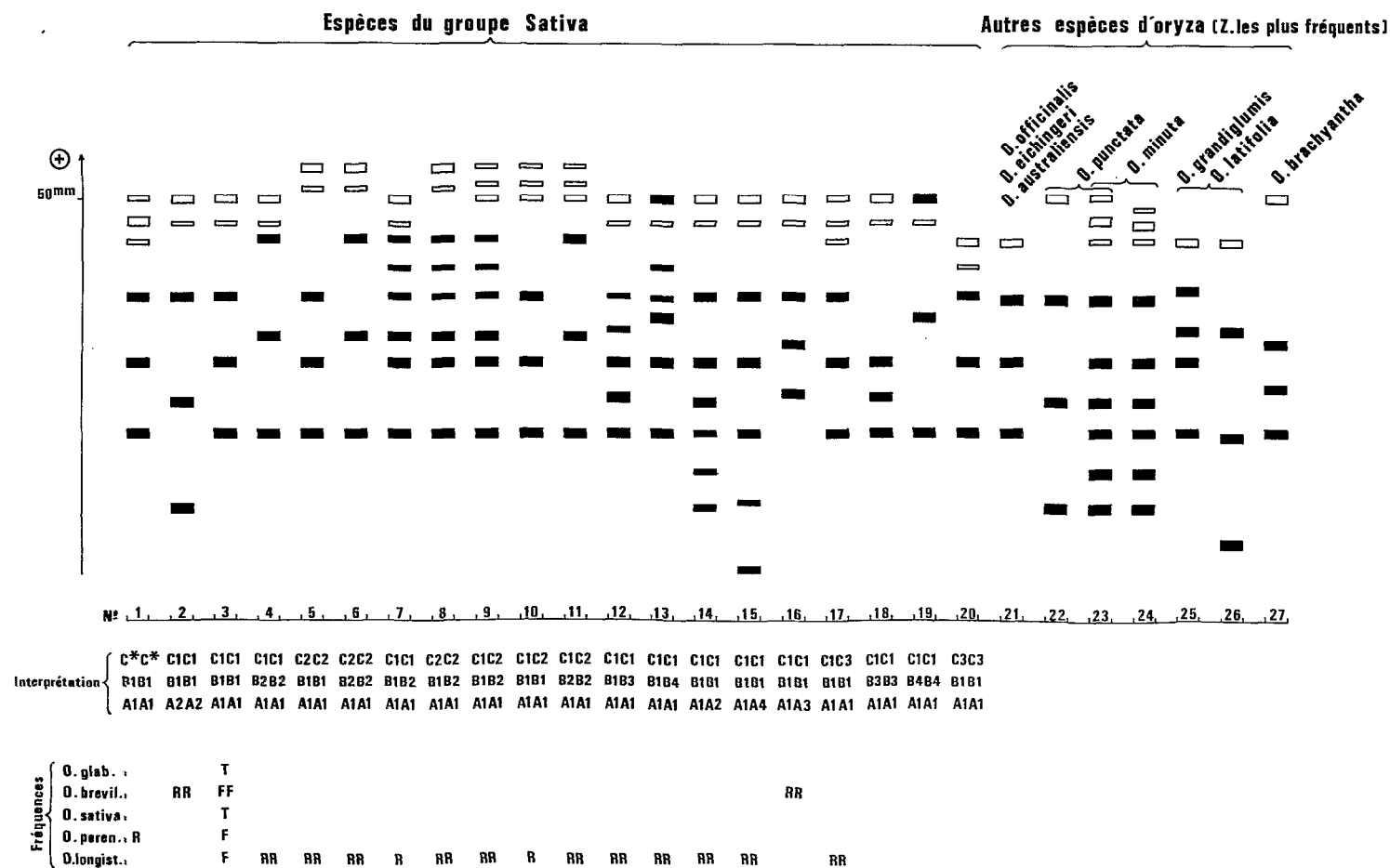
Les loci A et B codent le groupe des 3 à 6 bandes les plus lentes. Le cas de l'hybride entre individus présentant les Z. N° 2 et 3 a été étudié dans deux croisements dans l'espèce *O. breviligulata* : il présente le Z. N° 14 à 6 bandes, également rencontré dans certaines populations d'*O. longistaminata*. 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 ₁ A ₁ B ₁ B ₁	A ₁ A ₂ B ₁ B ₁	A ₂ A ₂ B ₁ B ₁
Phénotype (Produits dimères)	B ₁ B ₁ 1/4	B ₁ B ₁ 1/4	B ₁ B ₁ 1/4
	A ₁ B ₁ 1/2	A ₁ B ₁ 1/4	
		A ₂ B ₁ 1/4	A ₂ B ₁ 1/2
	A ₁ A ₁ 1/4	A ₁ A ₁ 1/16	
		A ₂ A ₁ 1/8	
		A ₂ A ₂ 1/16	A ₂ A ₂ 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.

ZYMOGRAMMES DE MALATE DESHYDROGENASE



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

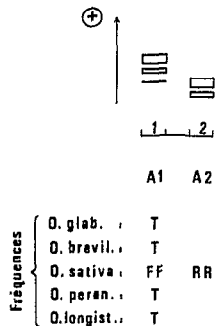
La même bande dédoublée est régulièrement observée dans toutes les espèces du groupe *Sativa*. Une seule exception a été trouvée dans la variété Sunbonnet d'*O. sativa* qui présente une bande légèrement plus lente.

6. PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASE (GPD) Fig. 5

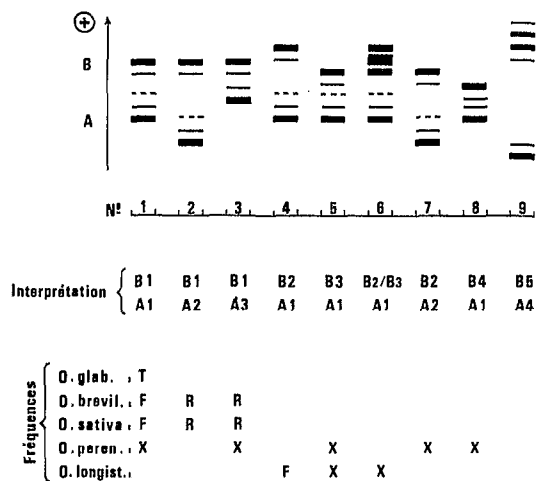
Deux bandes principales extrêmes sont distinguées avec des bandes intercalaires représentant probablement des isozymes secondaires.

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



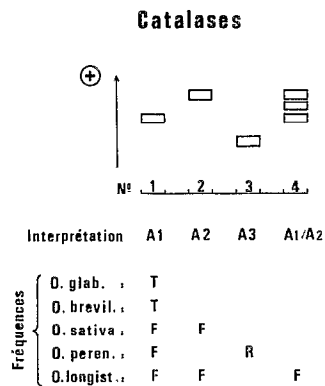
ZYMOGRAMMES 6-PHOSPHO-GLUCONATE-DESHYDROGENASES



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*.

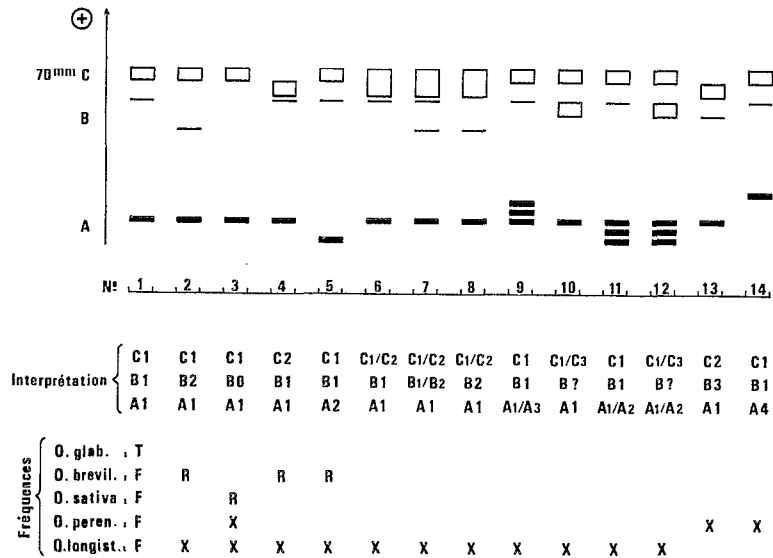
Les bandes E1 et E2 distinguent (sans exception relevée) les 2 espèces cultivées. Chez *O. breviligulata*, la bande E2 ne se rencontre qu'à l'Est du lac Tchad et en Afrique de l'Est et du Sud.

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.

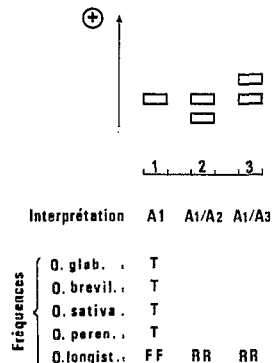
ZYMOGRAMMES DE GLUTAMATE-OXALATE-TRANSAMINASES



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 α et β 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 ₁	F ₂			
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 ₁	++	-	Brune	Fine	Très sensible au stade. Apparaît le mieux sur des parties blan- ches de feuilles F ₁
F ₂	+	+++	Brune	1/2 épaisse	Superposée à H mais de colora- tion plus intense. Son homologie avec F ₁ 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 ₂
I	++	+++	Brune	Diffuse	Parfois dédoublée.
J	-	+++	Brune	Fine	Intensité variable selon les individus.

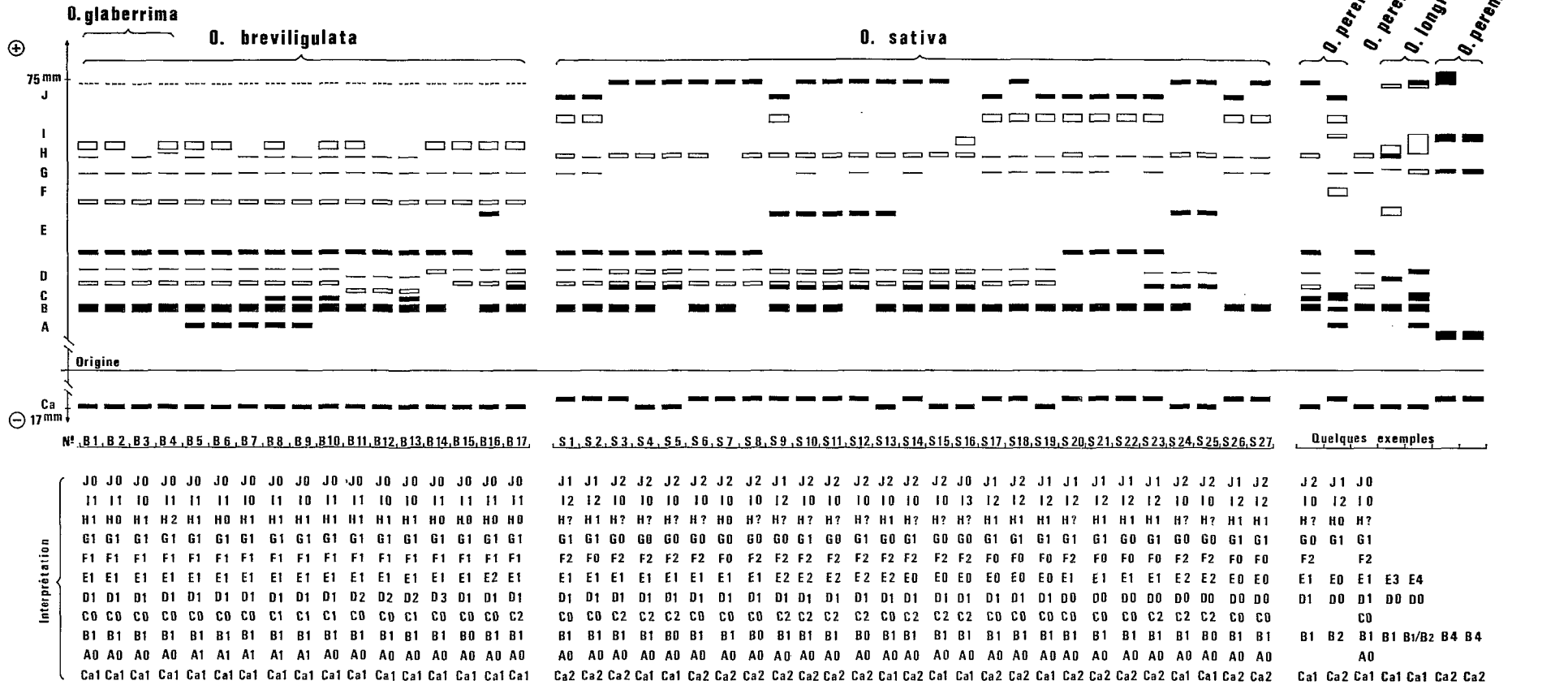
TABLEAU 4 : Quelques caractéristiques d'aspect des bandes d'estérases, à deux stades de développement des feuilles.

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

F₁ : Partie verte d'une jeune feuille en développement

F₂ : Limbe d'une feuille entièrement développée.

ZYMOGRAMMES D'ESTERASES



O. brevil. : F F F R R R R RR RR RR RR RR RR RR RR RR RR } Fréquences
 O. glab. : F F F R

(Résultats cumulés de deux analyses sur feuilles en croissance et entièrement développées)

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.

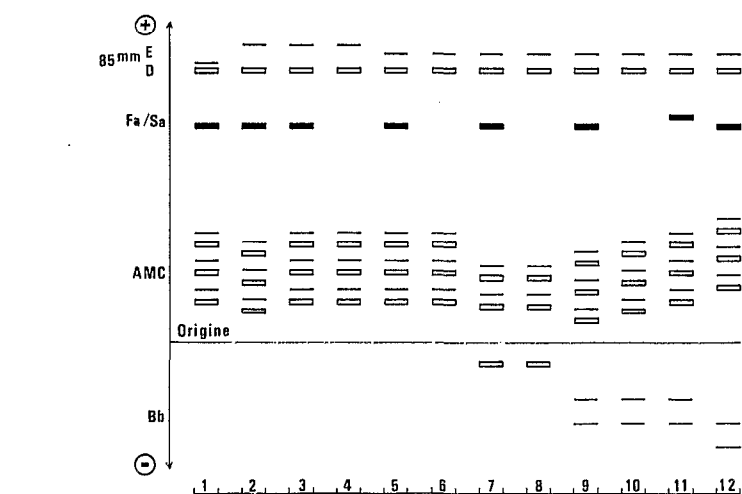
Un groupe de bandes anodiques rapides supplémentaires a été observé (bandes E) avec, dans l'espèce *O. breviligulata*, des variants lents et rapides par rapport à la bande commune aux différentes espèces.

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 répétables. 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).

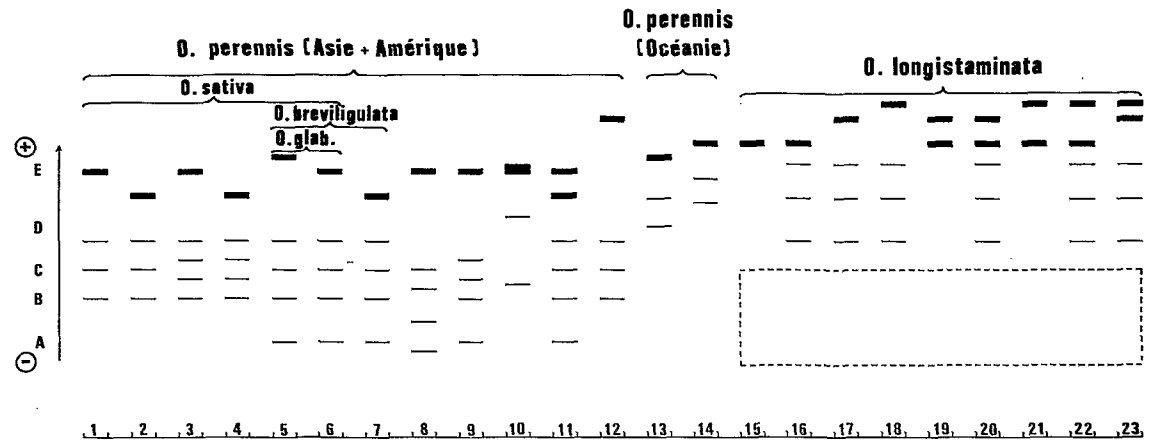
Les diverses combinaisons 2 à 2 des bandes E4, E5 et E6 ont été observées dans l'espèce *O. longistaminata*. La distribution panmictique des génotypes pour le locus E a été vérifiée (voir tableau 1-5).

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	D1	D1	D1	D1	D1	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.

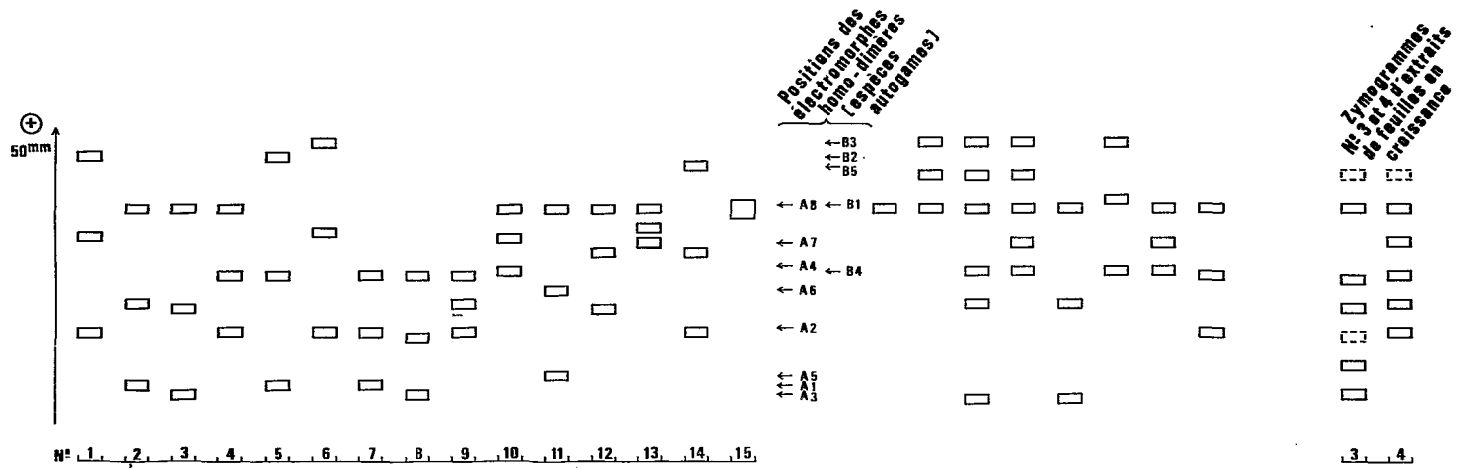
Des zymogrammes à 1, 3 ou 4 à 7 bandes sont observés parmi l'espèce *O. longistaminata*.

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 A₁, A₁ et A₂, A₂ 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 B₁ et variants ± 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 B₁ 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 B3 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 : A₁ et EST : F₂.

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 (A₁ et A₃) ou identique (A₂).

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 : B₁ 59° est également fréquent dans les populations d'*O. perennis* australien alors que ce sont les formes B₁ 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*.

RÉFÉRENCES 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.

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ET TECHNIQUE OUTRE-MER

Direction générale :

24, rue Bayard - 75008 PARIS

Service des Publications :

70-74, route d'Aulnay - 93140 BONDY

O.R.S.T.O.M. Éditeur
Dépôt légal : 2e trim. 1980
I.S.B.N. : 2-7099-0569-8