

Variabilité enzymatique des riz traditionnels malgaches *Oryza sativa* L.

A. DE KOCHKO (1)

RÉSUMÉ — Plus de quatre cents plantes de riz traditionnel, collectées à Madagascar, ont été analysées par électrophorèse en vue d'étudier leur polymorphisme enzymatique. La variabilité globale rencontrée sur la Grande Ile s'est avérée importante, dix-sept loci polymorphes ont été dénombrés. Certains allèles fréquents en Afrique sont rares, voire absents à Madagascar, mais certains nouveaux allèles rares y ont été identifiés, ce qui laisse supposer des origines d'introduction et des axes d'évolution particuliers. En dehors des sous-espèces *indica* et *japonica*, Madagascar renferme un groupe de plantes caractéristiques des hauts plateaux, issues de recombinaisons intersubspécifiques.

Mots clés : Riz, Madagascar, variabilité, isozyme, évolution.

Le riz cultivé d'origine asiatique, *Oryza sativa* L., est largement distribué à travers le monde ; il se rencontre dans des environnements très diversifiés et ses conditions de culture sont des plus variées.

Afin de décrire la variabilité de cette espèce (voir revue d'OKA, 1983), de très nombreux travaux se sont fondés sur des marqueurs aussi différents que les caractères morphophysiologiques (OKA, 1958 ; JACQUOT et ARNAUD, 1979 ; MORISHIMA et OKA, 1981), les phénomènes de stérilité dans les descendances de croisements (OKA, 1958, SECOND, 1982), les caractères enzymatiques (SECOND, 1984 ; GLASZMANN *et al.*, 1984 ; DE KOCHKO, 1987a). Ces études ont amené à élargir la simple distinction en deux groupes, *indica* et *japonica*, qui avait été énoncée par KATO (1930).

O. Sativa exhibe en particulier un polymorphisme enzymatique important. Ces marqueurs enzymatiques rendent compte de la variabilité de cette espèce et permettent également sa classification en groupes distincts caractérisés par des associations multialléliques particulières, en relation avec un classement élaboré en fonction de nombreux marqueurs morphophysiologiques (GLASZMANN *et al.*, 1984).

Nous avons utilisé la diversité isoenzymatique pour évaluer la variabilité des riz traditionnels malgaches, supposés très diversifiés eu égard à la complexité de la ri-

ziculture sur la Grande Ile et à l'histoire de son peuplement, constitué à la suite de nombreuses immigrations.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Les plantes analysées par électrophorèse sont issues de prospections effectuées à Madagascar par différents instituts, le FOFIFA*, l'ORSTOM, l'IBPGR**. Ces plantes sont maintenant en collection à l'IRRI*** aux Philippines et à l'ORSTOM en Côte-d'Ivoire. Ces prospections, réalisées de 1984 à 1986, couvrent :

- les hauts plateaux, du lac Alaotra (DE KOCHKO, 1985) à Fianarantsoa ;
- le sud-est, région de l'Ikongo ;
- la région de Mahajanga (nord-ouest).

Quatre cent sept plantes, représentant trois cent cinquante-cinq échantillons de prospection, ont été analysées. Lorsque l'échantillon de prospection était constitué par une panicule, une seule plante a été observée ; s'il s'agissait d'un vrac de graines, deux plantes, au moins, ont été étudiées.

Electrophorèse

Les techniques d'extraction, de migration et de révélation pour les systèmes enzymatiques considérés sont décrites dans SECOND et TROUSLOT (1980) et dans DE KOCHKO (1987a). Le tableau I donne la liste des différents systèmes utilisés.

Analyses multivariées

Les analyses statistiques ont été réalisées sur micro-ordinateur à l'aide du logiciel NDMS****.

* FOFIFA : Foibe Fikaromana Fambolena, Antananarivo, Madagascar.

** IBPGR : International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italie.

*** IRRI : International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.

**** NDMS : Noirot, Desjardins, Mullon, Savy. Concepteurs du logiciel.

(1) Centre ORSTOM d'Adiopodoumé, BP V51, Abidjan, Côte-d'Ivoire.



Tableau I Systèmes enzymatiques analysés.

Enzyme	Abréviation	Référence
Oxydo-réductases		
Peroxydase	POX	Second et Trouslot, 1980
Catalase	CAT	<i>id.</i>
Alcool Deshydrogénase	Adh	<i>id.</i>
Glutamate Deshydrogénase	Gdh	<i>id.</i>
Malate Deshydrogénase	Mdh	<i>id.</i>
Isocitrate Deshydrogénase	ICD	<i>id.</i>
Phosphogluconate Deshydrogénase	PDG	<i>id.</i>
Shikimate Deshydrogénase	Skdh	Weeden et Gottlieb, (cité par Tanksley et Rick 1980)
Transférases		
Glutamateoxaloacétate Transaminase	GOT	Second et Trouslot, 1980
Phosphogluco mutase	PGM	<i>id.</i>
Isomérase		
Phosphogluco isomérase	PGI	<i>id.</i>
Hydrolases		
Estérase	EST	<i>id.</i>
Leucine Amino peptidase	LAP	<i>id.</i>
Phosphatase Acide	PAC	<i>id.</i>
Endopeptidase	EP	Cardy <i>et al.</i> , 1982

Résultats

Diversité génétique

Les 15 systèmes enzymatiques observés représentent au moins 37 loci génétiques présumés (SECOND et TROUSLOT, 1980). Suivant les interprétations, d'autres bandes peuvent être considérées, ce qui peut porter le nombre de loci à plus de 40.

Sur les 37 loci retenus, 30 ne présentent aucune ambiguïté quant à leur interprétation. Ce sont ces loci qui ont servi dans la présente étude.

Parmi ces 30 loci, 11 sont hautement polymorphes, 6 présentent des allèles rares et 13 sont strictement monomorphes. Ces données sont résumées dans le tableau II.

L'indice d'hétérozygotie moyenne de NEI (1975), calculé sur 30 loci, est de $H = 0,15$. Calculé sur les 17 loci polymorphes, il est de $H = 0,26$. Ces valeurs peuvent être comparées à celles obtenues sur un échantillon africain où, pour les mêmes systèmes enzymatiques analysés, 22 loci parmi les 30 se sont montrés polymorphes, l'indice de NEI étant de $H = 0,18$. Le tableau III donne les résultats obtenus à Madagascar et en Afrique.

Il est intéressant de noter que, si Madagascar ne renferme pas une très grande diversité génétique calculée sur la base de l'hétérozygotie de NEI, en revanche, il s'y rencontre des situations particulières qui se remarquent, entre autres, par l'identification de nouveaux allèles jamais observés ailleurs chez *O. sativa*.

Tableau II Polymorphisme de 30 loci enzymatiques à Madagascar.

Loci polymorphes (1)	Nombre d'allèles	Loci présentant des allèles rares (2)	Loci monomorphes (3)
EST Ca	2	EST B	POX A
EST D	2	POX C	POX D*
EST E	3	PGI B	POX E
POX B	2	EP A	PGD B
LAP E	2	GOT B	GOT A*
PGI A	2	Mdh A	GOT C*
PGD A	3		Gdh A
CAT A	2		Gdh B
Skdh A	2		Mdh B
PAC Amc	2		Mdh C
PAC FA	2		ICD A*
			PGM A
			Adh A*

(1) Au moins deux allèles dont les fréquences sont supérieures à 0,05.

(2) Présentent deux allèles dont l'un a une fréquence inférieure à 0,05.

(3) Un seul allèle.

* Loci à allèles rares en Afrique, (De Kochko 1987a).

C'est le cas de plusieurs allèles au locus POX C (que nous avons notés C4 et C5), de l'allèle A3 au locus EP A et de l'allèle nul observé au locus Mdh A, locus strictement monomorphe chez *O. sativa*.

Au contraire, certains allèles fréquents en Afrique ne se rencontrent pas ou guère à Madagascar. Il en est ainsi de POX B4, qui y est rare ; EST B0 très rare sur la Grande Ile est fréquent en Afrique de l'Est, tout comme

Tableau III Indices de diversité génétique à Madagascar et en Afrique calculés sur 30 loci.

	Nombre de loci polymorphes (1)	Nombre d'allèles aux loci polymorphes	Nombre d'allèles par locus polymorphe	Hétérozygotie moyenne
Madagascar	17	39	2,29	0,15
Afrique	22	56	2,55	0,18

(1) Sont considérés comme polymorphes tous les loci qui ont plus d'un allèle.

PGI B2, qui se rencontre dans la région de Mahajanga, sur la côte face à l'Afrique. EP A0 n'a été identifié qu'une fois.

POX C2 et Skdh A5 sont totalement absents, il s'agit d'allèles rares également en Afrique. (DE KOCHKO, 1987 a et b).

Classification

Pour procéder aux analyses multivariées, nous avons éliminé de la liste des variables les loci monomorphes, qui n'apportent aucune information, de même que les allèles rares ($f < 0,05$), qui entraînent un déséquilibre trop important.

Sur les 30 loci de départ, il reste 11 loci répondant à ces conditions. On a ajouté à ces 11 loci les résultats obtenus par la réaction phénol assimilée à un locus enzymatique (phénol oxydase) à deux allèles : présence ou absence. Au total 26 modalités, représentant chacune un allèle, ont servi aux analyses suivantes.

Analyse factorielle des correspondances (AFC)

Une première analyse menée sur les 407 plantes, après constitution d'un tableau de Burt sur les modalités, permet de dégager un grand axe de diversification, l'axe 1, qui représente à lui seul 75 % de la variabilité globale.

Cette première AFC permet de supprimer les répétitions, c'est-à-dire de ne garder qu'un individu lorsque plusieurs présentent la même association de variables sur les 26 considérées. Une fois ce tri effectué, il reste 91 individus. En d'autres termes, les 26 allèles définissent 91 génotypes différents, sur 9 216 possibles, parmi les 407 plantes analysées.

Ce résultat peut être comparé à celui observé en Afrique, où pour ces mêmes allèles, 143 génotypes différents ont été identifiés sur près de 700 plantes analysées (résultats personnels).

Une seconde AFC, menée sur les 91 génotypes, montre un résultat comparable, un grand axe de diversification, l'axe 1, qui représente cette fois 76 % de la variabilité totale du nuage (figure 1a). Cet axe définit la différence entre *indica* et *japonica* que l'on rencontre chez *O. sativa*.

A l'inverse de la situation observée en Afrique, où les deux ensembles se définissent distinctement, on remarque qu'à Madagascar il existe un continuum entre les deux formes.

Les variables se répartissent également principalement le long de l'axe 1 et l'on remarque la distribution très nette des marqueurs *japonica* vers les valeurs négatives de l'axe 1 et des marqueurs caractéristiques du type *indica*, vers les valeurs positives de cet axe (figure 1b).

La variabilité existant au sein des *indica* paraît plus élevée que celle existant au sein des *japonica*, les individus de ce groupe s'étalant beaucoup plus le long de l'axe 2.

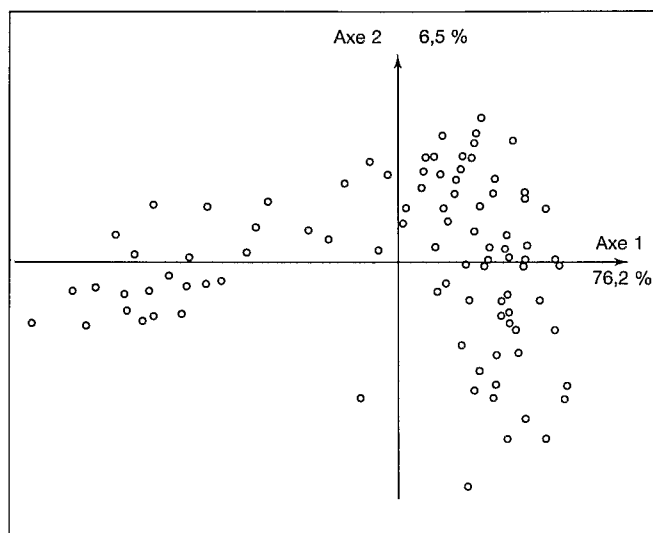


Figure 1a : Projection des individus uniques sur le plan défini par les deux premiers axes d'une Analyse Factorielle des Correspondances, qui représentent 83 % de l'inertie globale du nuage.

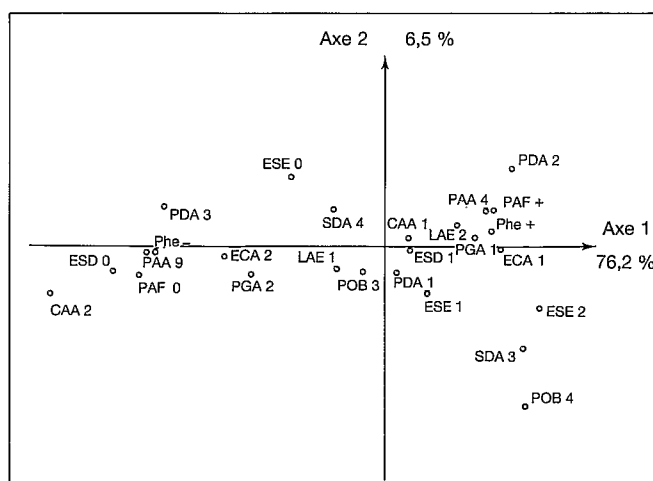


Figure 1b : Projection des variables dans le même plan.

Nuées dynamiques (ND) et analyse factorielle discriminante (AFD)

Afin de mieux décrire la variabilité de chaque type, des nuées dynamiques ont été réalisées sur les variables et les individus en utilisant les quatre premiers facteurs obtenus après la deuxième AFC (ils représentent 89,6 % de l'inertie totale du nuage). La stabilité des groupes obtenus est évaluée par des analyses discriminantes.

Finalement, ces analyses font apparaître quatre groupes. Une AFD menée sur les coordonnées factorielles obtenues par l'AFC donne 100 % de bien classés après trois pas. La description des groupes est donnée dans le tableau IV. La figure 2 montre la position des groupes sur le plan défini par les deux premiers axes de l'AFC.

Les allèles sont considérés *indica* ou *japonica* d'après GLASZMANN *et al.* (1984) et SECOND (1982, 1984), sauf en ce qui concerne LAP E2, que le dernier auteur qualifie, avec réserve, de *japonica* mais qui ne peut l'être au vu des résultats de GLASZMANN *et al.* (1984) et DE KOCHKO (1987 a-b) ainsi que de ceux obtenus dans la présente étude. Les données de ces auteurs sont confirmées par la position des variables sur l'axe 1 de l'AFC

Tableau IV Fréquences alléliques dans les différents groupes définis à Madagascar.

Loci	Allèle	I	II	III	IV
EST Ca	1	0	0,87	0,86	0,68
	2	1	0,13	0,14	0,32
EST D	0	0,31	0	0,04	0
	1	0,69	1	0,96	1
EST E	0	0,72	0,54	0	0
	1	0,28	0,23	0,96	0,08
POB B	2	0	0,23	0,04	0,92
	3	1	1	0,61	0,44
LAP E	4	0	0	0,39	0,56
	1	0,95	0,23	0,18	0,64
PGI A	2	0,05	0,67	0,82	0,36
	1	0,01	0,94	0,54	0,96
PGD A	2	0,99	0,06	0,46	0,04
	1	0,74	0,46	1	0,8
CAT A	2	0	0,54	0	0,12
	3	0,26	0	0	0,08
SKdh A	1	0,88	1	1	1
	2	0,12	0	0	0
PAC Amc	3	0	0,04	0,57	0,88
	4	1	0,96	0,43	0,12
PAC Fa	4	0,01	> 0,99	1	0,96
	9	0,99	< 0,01	0	0,04
Phe	+	0,04	> 0,99	1	0,96
	0	0,96	< 0,01	0	0,04
Effectif	+	0,05	0,99	1	1
	-	0,95	0,01	0	0
		151	189	33	34

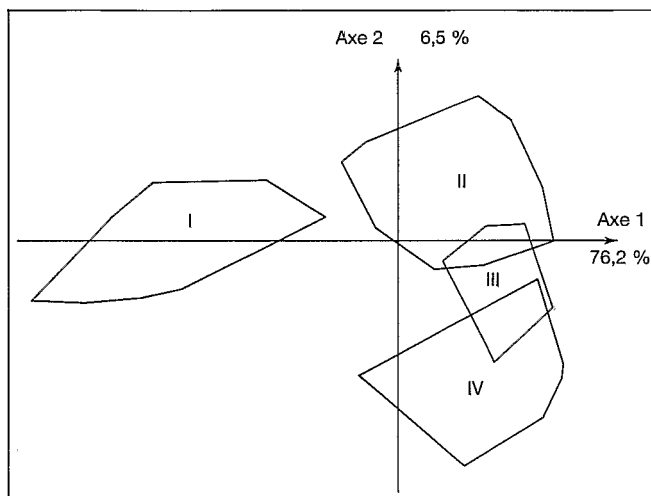


Figure 2 : Représentation des groupes sur le plan défini par les deux premiers axes de l'AFC.

(Figure 1b) : les allèles considérés comme *japonica* se trouvent effectivement aux valeurs négatives de cet axe, les allèles *indica* vers les valeurs positives du même axe, alors que les allèles communs aux deux types se situent près de l'origine.

Le premier groupe renferme les variétés caractérisées par les marqueurs isozymiques du type *japonica* : elles sont presque toutes (95 %) négatives au phénol et se situent aux valeurs négatives de l'axe 1 de l'AFC. Ce groupe se compose de variétés provenant principalement du sud-est et contient également quelques variétés récoltées en altitude (> 1 500 m), et les riz de tavy* et de tanety** de la région du lac Alaotra.

Le groupe II, le plus particulier à Madagascar, est largement majoritaire. Les variétés qui le composent proviennent en quasi-totalité des hauts plateaux et se caractérisent par une fréquence élevée de l'allèle EST E0 (54 % des variétés du groupe), allèle considéré comme *japonica*. De plus, les associations alléliques que l'on y trouve résultent de recombinaisons entre marqueurs des deux types *indica* et *japonica*, en particulier l'association EST E0-LAP E2, très rare ailleurs en Afrique (DE KOCHKO, 1987b) et aussi en Asie (GLASZMANN *et al.*, 1984).

Deux autres groupes sont caractéristiques du type *indica*. Le groupe III renferme des variétés principalement originaires de la région de Mahajanga, dont les génotypes comportent une majorité de marqueurs *indica* ou communs aux deux types.

Le groupe IV contient des variétés dont les marqueurs les plus fréquents sont des marqueurs *indica*. Ce groupe peut être considéré comme celui des *indica* typiques. Les variétés qui le composent se rencontrent surtout dans la région du lac Alaotra et celle de Mahajanga.

* Tavy : culture sur brûlis à flanc de coteau.

** Tanety : culture sur collines arides.

Les variétés entrant dans la composition des trois derniers groupes sont en très grande majorité positives au phénol (> 99 %) ; elles se situent vers les valeurs positives de l'axe 1 de l'AFC.

Discussion

Les résultats précédemment exposés montrent que Madagascar renferme une importante variabilité de l'espèce *O. sativa*. C'est historiquement cohérent car la riziculture ancienne de la Grande Ile était très diversifiée géographiquement et techniquement. Son peuplement humain varié a probablement amené des introductions multiples et d'origines diverses.

On retrouve à Madagascar la grande distinction de l'espèce entre les deux sous-espèces *indica* et *japonica*, chacune d'elles étant caractéristique d'un certain type de riziculture. Les variétés *japonica* se rencontrent principalement dans le sud-est, où l'on pratique la riziculture pluviale, ainsi que sur les tavy et tanety, également en riziculture pluviale. Mais on les trouve aussi parmi les riz d'altitude (aux environs de 1 800 m), cultivés en rizières mais dans des conditions climatiques quelquefois rigoureuses qui peuvent se rapprocher de celles existant dans la région présumée d'origine de ce type (SECOND, 1982).

Les variétés de type *indica* se rencontrent dans la région de Mahajanga, celle du lac Alaotra et sur les hauts plateaux vers Antananarivo, Antsirabé et Fianarantsoa, où elles sont cultivées exclusivement en rizières inondées.

Cependant, Madagascar se singularise par la présence de nombreuses variétés que l'analyse enzymatique identifie comme recombinants entre les deux types *indica* et *japonica*. Ces variétés, qui se classent dans le groupe II, se rencontrent principalement sur les hauts plateaux, environnement auquel elles semblent particulièrement adaptées. Ces variétés intermédiaires sont rares en Afrique où elles ne se rencontrent que ponctuellement.

L'existence de ces variétés dénote un axe de diversification particulier à Madagascar, où les conditions environnementales ont probablement exercé une pression de sélection en faveur des hybrides intersubspécifiques, dont l'origine naturelle est pourtant limitée, du fait des phénomènes de stérilité qui se rencontrent fréquemment dans les croisements *indica-japonica* (OKA, 1958 ; SECOND, 1982).

Il n'est toutefois pas possible d'écarter l'hypothèse d'une introduction propre à Madagascar de certains génotypes rares en Asie, génotypes qui se sont bien adaptés aux conditions existant sur les hauts plateaux malgaches.

Dans les régions de contact entre variétés des deux types, on note l'existence d'allèles rares jamais signalés par ailleurs chez *O. sativa*, tels que Mdh A0, EP A3 ou POX C4-C5. Ceci laisse penser qu'il s'agit de mutations dont l'origine pourrait être attribuée à l'effet mutagène

des croisements intersubspécifiques (HUNT et SELANDER, 1973 ; SAGE et SELANDER, 1979). Au niveau moléculaire, ces mutations peuvent être le résultat secondaire de recombinaisons intragéniques ou de l'action d'un transposon. Cette dernière hypothèse pourrait surtout expliquer l'apparition de l'allèle nul (A0) au locus Mdh A (DE KOCHKO, 1987a).

La comparaison des situations rencontrées à Madagascar et en Afrique de l'Est montre que les origines d'introduction ont dû être différentes, sauf peut-être pour la région de Mahajanga, où l'on retrouve les mêmes génotypes qu'en Tanzanie. Il est cependant impossible, dans l'état actuel des connaissances, de déduire le sens d'introduction, d'Afrique vers Madagascar ou réciproquement, ces variétés pouvant aussi avoir une origine asiatique commune.

Reçu le 24 juin 1987.
Accepté le 18 novembre 1988.

Remerciements. L'auteur remercie vivement MM. BOKA, LAGOU KOUADIO et GUELA BLEDEY pour leur aide technique dans la réalisation de ce travail. Il remercie l'IBPGR pour le financement d'une mission de prospection à Madagascar et l'envoi de toutes les variétés collectées par la suite sur la Grande Ile. Il exprime sa vive gratitude à M. G. SECOND pour les échanges d'idées et ses réflexions relatives à cette communication. Ce travail a bénéficié d'un financement de la CEE.

Références bibliographiques

- CARDY B.J., STUBER C.W., GOODMAN M.N., 1982. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize. Institute of Statistics Monograph, Ser. 1317, North Carolina State University.
- GLASZMANN J.C., 1982. Variabilité enzymatique du riz (*Oryza sativa* L.) - Son importance pour la compréhension de la structure de l'espèce. Thèse de Dr-Ing. INA, 280 p.
- GLASZMANN J.C., BENOIT H., ARNAUD M., 1984. Classification des riz cultivés (*Oryza sativa* L.). Utilisation de la variabilité isoenzymatique. L'Agron. Trop., 39 (1) : 51-66.
- HUNT W.G., SELANDER R.K., 1973. Biochemical genetics of hybridization in European house mice. Heredity, 31 : 11-33.
- JACQUOT M., ARNAUD M., 1979. Classification numérique de variétés de riz. L'Agron. Trop., 34 (2) : 153-173.
- KATO S., 1930. On the affinity of the cultivated varieties of rice plants, *Oryza sativa* L. J. Dpt. Agr., Kyushu Imp. Univ., 2 (9) : 241-276.
- KOCHKO (DE) A., 1985. Collecting rice in the lake Alaotra region in Madagascar. Pl. Genet. Resour. Newslt., 63 : 6-8.
- KOCHKO (DE) A., 1987a. Isozymic variability of traditional rice, *Oryza sativa* L. in Africa. Theor. Appl. Genet., 73 : 675-682.
- KOCHKO (DE) A., 1987b. A classification of traditional rice varieties (*Oryza sativa* L.) from Africa using isozymic variability. Evol. Trends in Plants, 1 (2) : 105-110.
- MORISHIMA H., OKA H.I., 1981. Phylogenetic differentiation of cultivated rice. XXII - Numerical evaluation of the *indica-japonica* differentiation. Jpn. J. Breed., 31 (4) : 402-415.

NEI M., 1975. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

OKA H.I., 1958. Intervarietal variation and classification of cultivated rice. Indian J. Genet. Plant Breed., 18 : 79-89.

OKA H.I., 1983. The *indica-japonica* differentiation of rice cultivars. A review. Fourth International SABRAO Congress, Kuala Lumpur (4-8 May 1981), p. 117-128.

SAGE R.D., SELANDER R.K., 1979. Hybridization between species of the *Rana pipiens* complex in central Texas. Evolution, 33 : 1069-1088.

SECOND G., 1982. Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza* sp.) : Study of the polymorphism scored at 40 isozyme locus. Jpn. J. Genet., 57 : 25-57.

SECOND G., 1984. Relations évolutives chez le genre *Oryza* et processus de domestication des riz. Thèse de doctorat d'Etat, université Paris-Sud, 189 p.

SECOND G., TROUSLOT P., 1980. Electrophorèse d'enzymes de riz. Travaux et Documents, ORSTOM, 120, 88 p.

TANKSLEY S.D., RICK C.M., 1980. Isozymic gene linkage map of the tomato. Applications in genetics and breeding. Theor. Appl. Genet., 57 : 161-170.

Summary

DE KOCHKO A. – Enzymatic variability of traditional rices in Madagascar. *Oryza sativa* L.

More than 400 traditional rice plants collected in Madagascar have been analysed by electrophoresis to study their enzymatic polymorphism. Global variability was found to be important on the Island : seventeen polymorphic loci were reported. If some alleles frequent in Africa are rare, and even absent in Madagascar, some new rare alleles were identified, thereby suggesting particular origins and evolution lines. So, in Madagascar, there is a group of characteristic Haut Plateau plants derived from intersubspecies recombination, in addition to the subspecies *indica* and *japonica*.

Key words : Rice, Madagascar, variability, isozyme, evolution.

Resumen

DE KOCHKO A. – Variabilidad enzimática de los arroces tradicionales malgaches. *Oryza sativa* L.

Más de cuatrocientas plantas de arroz tradicional procedentes de Madagascar han sido analizadas mediante electroforesis para estudiar su polimorfismo enzimático. Se observa una gran variabilidad global, habiéndose inventariado diecisiete loci polimorfos. No se observan, o son raros en la Gran Isla, ciertos alelos que se encuentran frecuentemente en Africa ; en cambio, se han identificado nuevos alelos raros, lo cual permite suponer orígenes de introducción y ejes de evolución particulares. Aparte de las subspecies *indica* y *japonica*, Madagascar posee un grupo de plantas características de los altiplanos, producto de recombinaciones intersubespecíficas.

Palabras-clave : Arroz, Madagascar, variabilidad, isozima, evolución.