

SOLUBILISATION D'ENZYMES HYDROLYTIQUES CHEZ *GOSSYPIUM HIRSUTUM*, *G. ANOMALUM* ET DES DERIVES DE L'HYBRIDATION ENTRE CES DEUX ESPECES

J. B. VIEIRA DA SILVA ET CH. POISSON

*Laboratoire de Physiologie Végétale, O.R.S.T.O.M.,
Boîte Postale 20, Abidjan et Laboratoire de Cytologie,
I.R.C.T., Boîte Postale 604, Bouaké, Côte d'Ivoire*

Hybrid derivatives between *Gossypium anomalum* and *G. hirsutum*, both $2n + 1$ aneuploids for chromosome 3 of *G. anomalum* and euploids derived from this segregating population, exhibit under osmotic stress conditions the same pattern of solubilization of the hydrolytic enzymes, β -fructofuranosidase, β -amylase and acid phosphatase, as the wild parent *G. anomalum*.

This biochemical relationship and the slightly changed phenotype, suggest that the hereditary material could have been transferred from *G. anomalum* to the euploids.

Introduction

Le transfert des caractères d'une espèce à une autre qui en est génétiquement éloignée se heurte souvent au défaut de fertilité des hybrides entre ces deux espèces. Cette incompatibilité est due en partie à l'irrégularité de la méiose, défaut qui peut être corrigé par le doublement à la colchicine du nombre chromosomique (Sears, 1941; Bell, 1950). Néanmoins, il advient fréquemment que cette intervention soit insuffisante; l'une des techniques utilisées en particulier au cours des tentatives d'amélioration du blé (Riley et Kimber, 1966), du tabac (Moav, 1958), du coton (M. S. Brown, 1966), entre autres, consiste en l'élaboration de races d'addition: un chromosome surnuméraire, à l'état simple ou à l'état double, d'une espèce donneuse est adjoint au génome complet d'une espèce réceptrice.

Le croisement entre l'espèce cultivée *G. hirsutum* et l'espèce sauvage *G. anomalum* donne lieu aux accidents énoncés ci-dessus; par contre, il a été possible d'obtenir une série de lignées d'addition dont l'identification est facilitée par les modifications morphologiques qu'induit la présence de tel ou tel chromosome. L'une d'elles se caractérise par un épaississement du limbe foliaire et paraît tolérer une certaine irrégularité pluviométrique; une partie des mécanismes de cette tolérance ayant fait l'objet de recherches antérieures sur le genre *Gossypium*, il paraissait intéressant de déterminer si l'effet obtenu sur certains dérivés d'hybrides entre *G. hirsutum* et *G. anomalum* est de même nature.

L'effet de la carence hydrique sur l'activité de la phosphatase acide chez *Gossypium thurberi* a été démontré au cours d'un travail antérieur (Vieira da Silva, 1968b); cet effet se manifeste de deux façons: augmentation du pourcentage d'enzyme soluble et augmentation de l'activité totale (soluble et liée ou particulaire).

Des études effectuées sur plusieurs espèces (Vieira da Silva, 1969) ont montré que chez *G. anomalum*, espèce résistante à la sécheresse, l'activité de la phosphatase acide demeure particulièrement constante, cette résistance doit cor-

respondre à une grande stabilité des organites auxquels se trouve associée l'enzyme, ce qui constituerait un facteur de sauvegarde du protoplasme vis-à-vis de la carence hydrique.

Par ailleurs, la sécheresse augmente l'activité d'autres enzymes hydrolytiques telles que la ribonucléase (Dove, 1967; Kessler, 1961; Vieira da Silva, 1968a), l'invertase (Vassiliev et Vassiliev, 1936; Oparine, 1953) et l'amylase (Spoehr et Milner, 1939); l'augmentation d'activité de ces deux dernières ne provoquerait pas d'effets très nuisibles sur le métabolisme cellulaire mais constituerait en quelque sorte une réaction adaptative, les glucides solubles diminuant le potentiel osmotique de la cellule (Vieira da Silva, 1968c).

Un essai a été établi sur *G. anomalum*, *G. hirsutum* et une descendance de l'hybridation de ces deux espèces ayant pour but de déterminer la nature des mécanismes de tolérance aux carences hydriques de ces descendances et de vérifier la liaison entre ces types d'activité enzymatique, celui de la phosphatase acide et celui de l'invertase et de l'amylase.

Matériel et Méthodes

Le matériel végétal utilisé était constitué de *G. hirsutum* variété Allen, *G. anomalum* et un dérivé de l'hybridation entre ces deux espèces, R 264, qui possède, en sus du génome de *G. hirsutum*, un chromosome, particulier, de *G. anomalum*. R 264 a été obtenu à l'issue d'une suite de croisements faisant intervenir *G. hirsutum* et *G. anomalum*, espèce africaine du groupe B. Ceux-ci ont abouti à la création d'une série de populations d'addition simple; chaque chromosome surnuméraire de *G. anomalum* a été identifié d'après les modifications phénotypiques qu'induit sa présence; une indexation a permis de désigner les chromosomes ainsi identifiés. L'addition en dose simple du chromosome 3, qui intervient dans la constitution de R 264, entraîne certaines modifications caractéristiques du phénotype (Kammacher et Poisson, 1964) parmi lesquelles un épaississement du limbe foliaire qui donne aux feuilles un aspect succulent. L'addition en dose double entraîne des effets tératologiques accompagnés d'une stérilité quasi totale; une telle population d'addition ne peut donc, jusqu'à l'heure actuelle, être perpétuée que par la descendance de plantes à $2n + 1$ chromosomes; le système de filiation utilisé, l'autofécondation, conduit à une population composée d'individus euploïdes ($2n$ chromosomes) et aneuploïdes, l'addition étant monosomique ($2n + 1$) ou disomique ($2n + 2$). La population R 264 comporte la particularité suivante: les individus euploïdes conservent certains aspects, morphologiquement atténués caractéristiques des plantes d'addition; sans être aussi charnues que celles des plantes d'addition, les feuilles sont néanmoins plus rigides que celles de *G. hirsutum*. Le déterminisme génétique de cette particularité est encore inconnu mais il n'est pas interdit de penser qu'un échange de matériel héréditaire s'est produit, au cours des générations antérieures, entre l'un ou l'autre des chromosomes de *G. hirsutum* et le chromosome étranger en provenance de *G. anomalum*; cette hypothèse s'est révélée invérifiable cytologiquement jusqu'à présent, aucune configuration anormale ne se révélant en métaphase. Seules ont été utilisées, au cours de cette expérience, les plantes d'addition monosomique désignées R 264a ($2n + 1$) et les plantes euploïdes, R 264b ($2n$).

Les plantes ont été cultivées en serre, dans une solution d'Hoagland modifiée; lorsque les plantes ont été âgées de trois mois, la carence hydrique a été induite par addition, aux solutions de culture, de polyéthylène glycol 600 en quantité suffisante pour abaisser le potentiel osmotique à -30 joules par mole. L'essai était établi en blocs au hasard à quatre répétitions.

En vue de mesurer l'activité enzymatique, un gramme de tissu foliaire (quatrième feuille à partir de l'apex) a été broyé dans un mortier refroidi avec une solution de mannitol 0,3 M glacée, (50 ml de volume final). Des essais préalables avaient montré qu'une centrifugation à 36.000 g pendant 15 minutes est suffisante pour sédimenter tous les organites responsables de l'activité enzymatique particulaire ou liée.

Les mesures d'activité portent, pour chaque échantillon, sur deux fractions: une fraction 'soluble' dosable dans le surnageant après centrifugation et une fraction 'totale' dosable dans le surnageant d'une prise comparable préalablement traitée par du Triton X-114 afin de permettre la solubilisation de l'enzyme particulaire ou liée. L'activité enzymatique due à la fraction soluble, a été calculée, à partir de ces données, en pourcentage de l'activité enzymatique due à la fraction totale.

La phosphatase acide (E C 3.1.3.2) a présenté un maximum d'activité à pH 5,5; elle a été dosée en présence du phénylphosphate disodique utilisé comme substrat. Le phénol libéré est dosé par le réactif de Folin-Ciocalteu.

La β -fructofuranosidase (E C 3.2.1.26) (invertase) a présenté un maximum d'activité à pH 5,0, le substrat utilisé étant le saccharose.

La β -amylase (E C 3.2.1.2) a présenté un maximum d'activité à pH 4,5, le substrat étant l'amidon soluble.

La méthode de Nelson (Colowick et Kaplan, 1957) a été utilisée, à issue de ces deux dernières déterminations, pour doser les sucres réducteurs.

TABLEAU I

Expression, en pourcentage, de la fraction 'soluble' d'enzyme par rapport à la fraction 'totale'

	Phosphatase acide		β -fructofuranosidase		β -amylase	
	Témoin	- 30J mole ⁻¹	Témoin	- 30J mole ⁻¹	Témoin	- 30J mole ⁻¹
<i>G. hirsutum</i>	78,0	95,0	51,5	90,5	56,9	86,9
<i>G. anomalum</i>	11,2	14,1	20,8	61,8	38,2	41,7
R 264a (2 n + 1)	2,5	26,3	10,2	55,0	29,3	83,6
R 264b (2 n)	3,9	18,8	3,8	77,8	21,5	73,0
p.p.d.s.:						
0,01	± 15,3		± 35,2		± 48,9	
0,05	± 20,8		± 47,8		± 66,3	

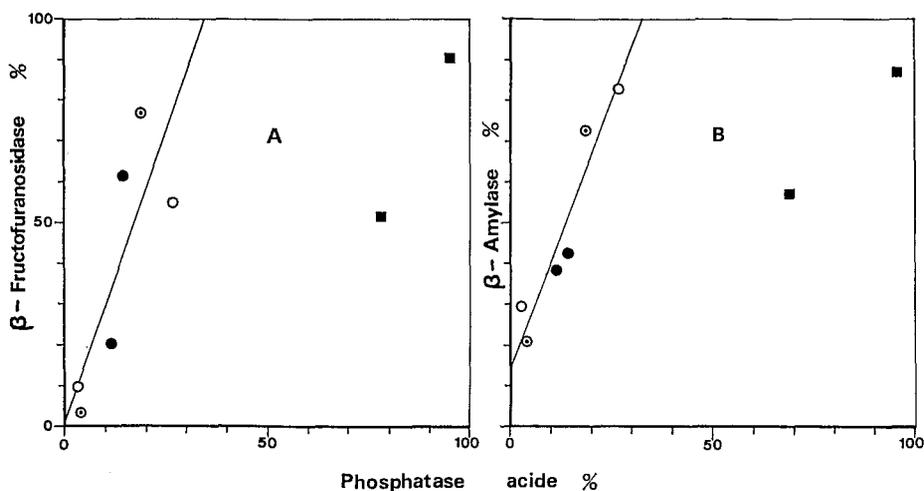


Fig. 1. A, Relation entre le pourcentage de solubilisation de la phosphatase acide et le pourcentage de solubilisation de la β -fructofuranosidase. Pour *G. anomalum* et ses hybrides: $y = 2,89x + 1,24$ $r = 0,86$, $p < 0,02$. B, Relation entre le pourcentage de la solubilisation de la phosphatase acide et le pourcentage de solubilisation de la β -amylase. Pour *G. anomalum* et ses hybrides: $y = 2,62x + 14,34$ $r = 0,95$, $p < 0,01$. ■ *G. hirsutum*, ● *G. anomalum*, ○ R 264 a ($2n + 1$), ○ R 264 b ($2n$).

Résultats et Discussions

Le tableau I groupe les résultats relatifs à la solubilisation des enzymes avec et sans effet du traitement osmotique.

La solubilité de la phosphatase acide permet de mettre en évidence deux groupes nettement séparés: l'un constitué par *G. hirsutum* et l'autre par *G. anomalum*, R 264a et R 264b dérivés de l'hybridation entre ces deux espèces.

L'examen des résultats relatifs à la solubilité de la β -fructofuranosidase et de la β -amylase révèle des différences moins nettes. Celles-ci apparaissent cependant plus clairement si on met en relation les pourcentages de fraction soluble de la phosphatase acide et de la β -fructofuranosidase d'une part, de la β -amylase d'autre part (Fig. 1). On constate alors l'existence de deux groupes séparés: l'un constitué par *G. hirsutum* et l'autre par *G. anomalum* et les dérivés d'hybridation déjà cités.

Cette série d'expériences montre donc que, si les activités enzymatiques paraissent effectivement liées, ces liaisons diffèrent néanmoins selon l'espèce ou l'hybride d'espèces considéré. Le fait que *G. anomalum*, R 264a et R 264b présentent des analogies d'ordre biochimique conduit à penser qu'une information génétique a été transférée de cette espèce à certains produits de son hybridation par *G. hirsutum*, y compris à la partie de la population R 264 dont les constituants sont apparemment euploïdes; ces observations confirment l'impression déjà obtenue par l'examen du phénotype.

L'analyse effectuée dans cette expérience pourrait constituer une méthode pour déceler, dans les descendances, les individus ayant des caractéristiques biochimiques de résistance à la carence hydrique dans les tissus.

Références

- Bell, G. H. D. 1950. Investigations in the Triticinae. I. Colchicine techniques for chromosome doubling in interspecific and intergeneric hybridization. *J. Agr. Sci.*, **40**: 9-18.
- Brown, M. S. 1966. Attributes of intra- and inter-specific aneuploidy in *Gossypium*. Chromosome Manipulation Plant Genet. 98-112.
- Colowick, S. P., and Kaplan. N. O. 1957. Methods in enzymology, **3**: 85-86. Academic Press, New York.
- Dove, L. D. 1967. Ribonuclease activity of stressed tomato leaflets. *Plant Physiol.* **42**: 1176-1178.
- Kammacher, P., et Poisson, Ch. 1964. Sur les possibilités de transférer du matériel génétique du cotonnier sauvage *Gossypium anomalum* Waw et Peyr. à l'espèce cultivée *Gossypium hirsutum* L. *Coton Fibres Trop.* **19**: 243-264.
- Kessler, B. 1961. Nucleic acids as factors in drought resistance of higher plants. *Recent Advan. Botany* **2**: 1153-1159.
- Moav, R. 1958. Inheritance in *Nicotiana tabacum* XXIX: the relationship of residual chromosome homology to interspecific gene transfer. *Am. Naturalist* **92**: 866, 267-278.
- Oparine. A. I. 1953. Variations de l'activité des enzymes dans la cellule végétale sous l'effet des facteurs extérieurs. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**: 67-82.
- Riley, R., and Kimber, G. 1966. The transfer of alien genetic variation to wheat. Rept. Plant Breeding Inst. Cambridge, 1964-65. pp. 6-36.
- Sears, E. R. 1941. Amphidiploids in the seven-chromosome Triticinae. *Res. Bull. Missouri Agr. Exp. Sta.* No. 336.
- Spoehr, H. A., and Milner, H. W. 1939. Starch dissolution and amyolytic activity in leaves. *Proc. Am. Phil. Soc.* **81**: 37-78.
- Vassiliev, I. M., and Vassiliev, M. G. 1936. Changes in carbohydrate content in wheat plant during the process of hardening for drought resistance. *Plant Physiol.* **2**: 115-125.
- Vieira da Silva, J. B. 1968a. Influence du potentiel osmotique du milieu de culture sur l'activité de la ribonucléase dans trois espèces de *Gossypium*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **266**: 2412-2415.
- Vieira da Silva, J. B. 1968b. Le potentiel osmotique du milieu de culture et l'activité soluble et latente de la phosphatase acide dans le *Gossypium thurberi*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **267**: 729-732.
- Vieira da Silva, J. B. 1968c. Influence du potentiel osmotique de la solution nutritive sur la teneur en glucides solubles et amidon de trois espèces de *Gossypium*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **267**: 1289-1292.
- Vieira da Silva, J. B. 1969. Comparaison entre cinq espèces de *Gossypium* quant à l'activité de la Phosphatase acide après un traitement osmotique. Etude de la vitesse de solubilisation et de formation de l'enzyme. *Z. Pflanzenphysiol.* **60**: 385-387.

**Solubilisation
d'enzymes hydrolytiques chez
Gossypium hirsutum, *G. anomalum*
et des dérivés de l'hybridation entre
ces deux espèces**

J. B. VIEIRA da SILVA et [CH. POISSON]

*Laboratoire de Physiologie Végétale, O.R.S.T.O.M.,
Boîte Postale 20, Abidjan et Laboratoire de Cytologie,
I.R.C.T., Boîte Postale 604, Bouaké, Côte d'Ivoire*

Reprinted in Canada from
**CANADIAN JOURNAL
OF
GENETICS AND CYTOLOGY**
Journal Canadien de Génétique et de Cytologie
Volume XI, Number 3, September 1969

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

18 JAN. 1970

Collection de Références

n° 13686