

**Etude des bases génétiques et cartographie de
QTLs de résistance du riz aux souches Africaines
de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, agent
pathogène de la bactériose vasculaire du riz**



Lambert Gustave DJEDATIN



République du Bénin
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI
Faculté des Sciences Agronomiques



THESE

Pour obtenir le diplôme de
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

Spécialité : Ressources phylogénétiques et protection des cultures

Option : **Génétique et Amélioration des plantes**

Etude des bases génétiques et cartographie de QTLs de résistance du riz aux souches Africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, agent pathogène de la bactériose vasculaire du riz

Présentée et soutenue publiquement le 12 Avril 2012 par

Lambert Gustave DJEDATIN

Devant le Jury :

Mr Adam AHANCHEDE, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi (Bénin) :	Président
Mr Ambaliou SANNI, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi (Bénin) :	Directeur
Mme Marie Noelle NDJIONDJOP, Directrice de recherche, AfricaRice Cotonou (Bénin) :	Co-Directrice
Mme Valérie Verdier, Directrice de recherche, IRD/Université de Colorado (USA) :	Co-Directrice
Mr Alain GHESQUIERE, Directeur de recherche, IRD Montpellier (France) :	Examineur
Mr Alain RIVAL, Directeur de recherche, CIRAD Montpellier (France) :	Rapporteur
Mr Bonaventure C. AHOHUENDO : Professeur, Université d'Abomey-Calavi (Bénin):	Rapporteur
Mr Yves Henry, Directeur de recherche, Orsay/Paris VI (France) :	Rapporteur

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Dr Marie Noëlle Ndjondjop, responsable de l'unité de biotechnologie du centre du riz pour l'Afrique qui a été à l'origine de cette thèse. C'est vous qui m'avez sélectionné sur un de vos projets financés par l'USAID pour développer des variétés de riz résistantes à plusieurs maladies dont la bactériose vasculaire, objet de la présente thèse. Nous avons connu d'énormes difficultés d'ordre administratif au démarrage de cette aventure, mais votre combativité a eu raison de toutes ces difficultés. Votre soutien indéfectible à la réussite de cette thèse s'est traduit par vos innombrables messages et lettres d'explication au bailleur pour obtenir des compléments de fonds. Avec votre engagement à mes côtés, nous avons pu décrocher un financement complémentaire du GCP « Generation Challenge Program » qui a pris en charge mon premier séjour en France. Comment passer sous silence les nombreux voyages que j'ai pu faire au cours de cette thèse grâce à vous ? Je veux citer mes séjours à Cornell University à New York, en Inde, en Roumanie, en Afrique du sud et bien d'autres pays qui m'ont permis de rencontrer d'autres chercheurs. Pour tout cela, vous resterez gravée dans ma mémoire à jamais.

Je voudrais ensuite remercier Drs Valérie Verdier et Alain Ghesquiere pour m'avoir accueilli, pendant trois ans, au Laboratoire de Génome et Développement des Plantes (LGDP) de l'Institut de Recherche pour le Développement IRD/Montpellier/France. Vous m'avez toujours assuré de votre disponibilité en étant tout le temps à mon écoute. Vos différents bureaux m'ont toujours été grandement ouverts. Je me souviens encore de ces samedis où Alain et moi avons toujours été surpris par la fermeture du centre, analysant et discutant des résultats de mes travaux. Je n'oublie pas aussi les longues heures partagées au labo et dans les serres en compagnie de Valérie qui m'a initié à la pathologie. Je suis très content de la formation que vous m'avez donnée et l'excellent cadre de travail que vous m'avez offert. J'ai fortement apprécié les réunions hebdomadaires de labo, le journal club qui a renforcé mes connaissances théoriques. Pendant mon séjour en France, vous avez été pour moi, non seulement des encadrants mais aussi des tuteurs car vous étiez très attentifs à mes conditions de vie. Pour tout cela, soyez-en remerciés.

A vous très cher Professeur Ambaliou Sanni, je témoigne toute ma gratitude. J'ai été très agréablement marqué par votre simplicité, votre sens de l'écoute et votre promptitude à réagir. Vous ne vous êtes jamais fait prier avant de me fournir un document administratif dont j'ai besoin. J'ai été très honoré de vos appels téléphoniques, depuis le Bénin ou même de l'extérieur où vous étiez en mission, chaque fois que vous m'envoyez un document, pour vous rassurer que je l'ai bien reçu. Lors de mes passages au Bénin, vous m'aviez toujours simplifié les formalités administratives et

organisé mes différents comités de thèse. Je vous remercie très sincèrement de votre soutien.

Un merci particulier aux différents bailleurs qui ont permis la réalisation de cette thèse. J'ai nommé l'USAID via AfricaRice, le GCP et l'IRD. Je remercie les différents membres de mon comité de thèse et du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Merci à toi, Dr Boris Szurek pour avoir encadré la dernière partie de cette thèse portant sur la cinétique bactérienne, l'induction et l'expression de gène, malgré les nombreux stagiaires que tu suivais. Je remercie Dr Mathias Lorieux pour les discussions fructueuses que nous avons eues à l'occasion de ces passages à l'IRD de Montpellier. Merci à Ralf Koebnik, Sébastien Cunnac, Laurence Albar, François Sabot, tous chercheurs du LGDP. Je n'oublie pas tous mes amis étudiants du labo avec qui, j'ai passé d'agréables moments ; j'ai nommé Mauricio, Guillaume, Yanua, Déless, Issa, Huanxo, Andréa, Alejandra, Elisabeth, Nathalia, Audrey, Céline, Erika et Gaëlle. A toi Julie Orjuela, je témoigne ma profonde gratitude pour les différentes fêtes auxquelles tu me conviais à Montpellier et à Nîmes et les moments agréables que nous partagions ensemble au bureau. Tout ceci a facilité mon intégration. A mes compagnons de premières heures que sont Nasser Yao, Honoré Kam et Mounir Sow, je dis un grand merci pour tout ce que nous avons partagé ensemble. Vous m'appelez affectueusement « Capitaine » et mon souhait est de voir notre équipe consolidée. En tournant cette page d'étudiant, je souhaite à toute l'équipe une brillante carrière professionnelle. Je dis également merci à tous les autres membres du laboratoire de biotechnologie d'AfricaRice et collègues de bureau pour leurs soutiens de différentes natures. Il s'agit de Mamadou Cissoko, David Montcho, Roland Bocco, Blandine Fatondji, Yonnelle Moukoumbi, Fissayo Koladé, Marie Goété, Emmanuel Mègnigbèto, Loris Gbédjissi, Euloge Ahanhanzo-Glèlè, Atika Mama, Zaki Bonou-Gbo, Arnaud Gouda, Florent Okry, Espérance Zossou, Carline Santos et Augustin Koudamiloro. Comment oublier en ce moment les Professeurs Daïnou Ogoubi, Clément Agbangla, Alexandre Dansi et Corneille Ahanhanzo-Glèlè du laboratoire de génétique de la FAST/UAC ? Je vous remercie d'avoir guidé mes premiers pas dans la recherche. Que mes parents géniteurs Séraphine Samba et Benoît Djédatin trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude. A toi, ma bien-aimée Blanche Kpatinkpo, je dois la réussite de cette thèse. Merci de ton courage et de ton soutien indéfectible. A tous mes frères et sœurs et aux nombreux amis qui m'ont soutenu, notamment Conforte Sèhounon, Hyacinthe Tokou, Lucien Sèmodo, André Djédatin, Rd Père Jean-Marie Houézo, Rd Père Nathanael Edé et Raphael Yébou, je dis sincère merci.

Résumé

Le riz est une culture céréalière d'importance mondiale. La bactériose vasculaire (BB), causée par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), est l'une des maladies les plus dévastatrices du riz à travers le monde notamment en Asie et en Afrique. De nombreux travaux ont été effectués en Asie tels que l'étude de la structure des populations de Xoo, les mécanismes d'infection et de défense de la plante, la cartographie de gènes de résistance et leur déploiement dans certaines variétés élites par la sélection assistée par marqueurs. Les travaux préliminaires effectués en Afrique ont permis de caractériser trois races A1, A2, A3 de Xoo qui sont génétiquement distinctes de celles d'Asie. Au cours de cette thèse, la recherche de sources de résistance appropriées aux souches africaines de Xoo a conduit à l'évaluation de cent sept accessions de riz cultivé africain *Oryza glaberrima* en conditions contrôlées, pour leur résistance à cinq souches de Xoo originaires du Burkina-Faso et du Mali, représentant les trois races africaines et une souche asiatique (témoin). Vingt accessions ont été résistantes à la race A3 de Xoo. Les techniques de « CAPS markers » (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) et de « Dot Blot » ont été utilisées respectivement pour la recherche de xa5 et Xa21, deux gènes de résistance fréquemment utilisés dans la riziculture asiatique. Les résultats ont montré que ces gènes ne sont pas impliqués dans la résistance d'*O. glaberrima* qui présente une base génétique très étroite de la résistance à la bactériose. En vue de cartographier des gènes de résistance chez le riz asiatique *Oryza sativa*, la population de cartographie constituée de 178 lignées recombinantes issues du croisement IR64 x Azucena par la méthode de « Single Seeds Descent » a été utilisée de même que la carte génétique de la même population saturée de 226 marqueurs microsatellites. Pour la première fois, la cartographie d'intervalles à l'aide de WinQTLCartographer 2.5 et Qgene-4.3.0 a montré que les souches africaines de Xoo ont induit cinq QTLs contrôlant 10 à 37% de la variation phénotypique et qui sont différents de ceux induits par les souches asiatiques à l'exception de celui identifié sur le chromosome 11. Les 17 QTLs et 35 gènes majeurs de résistance déjà connus contre les souches Xoo d'Asie et cartographiés dans différentes populations, de même que les QTLs identifiés dans cette étude, ont été re-cartographiés sur la carte physique Nipponbare. Plusieurs co-localisations de QTLs/gènes communs aux souches africaines et asiatiques de Xoo ont été mises en évidence sur les chromosomes 1, 7, 10 et 11. Les QTLs spécifiques sont localisés sur les chromosomes 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 et 12. Les études de descendance et de cinétique de croissance bactérienne ont montré que les QTLs des chromosomes 7 et 11 contrôlant la résistance aux souches africaines de Xoo ont une hérédité récessive alors que la majorité des gènes de résistance aux souches asiatiques sont dominants. En conclusion, il ressort de cette étude que contrairement au riz africain *Oryza glaberrima* qui constitue une base étroite pour la résistance aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, le riz asiatique *Oryza sativa* représente une meilleure base génétique de résistance à la bactériose africaine dont l'hérédité est plutôt récessive.

Mots clés : Riz, bactériose vasculaire, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, cartographie, QTL et gènes de résistance

Genetic basis and mapping of rice resistance to African strains of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, the causal agent of bacterial blight in rice

Abstract

Rice is one of the most important cultivated cereal crops across the world. Bacterial blight (BB), caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), is one of the most devastating diseases of rice worldwide. Many studies, such as the pathogens populations' structure, the mechanisms of disease and the plant defence, the mapping of numerous resistance genes and their deployment in certain elites varieties by markers assisted selection, were carried out in Asia. Recent characterization of African strains of *Xoo* evidenced three new races A1, A2 and A3 which were genetically distinct from those from Asia. In this study, we evaluated 107 accessions of African cultivated rice *Oryza glaberrima* in greenhouse, under controlled conditions, for their resistance to five strains of *Xoo* originating from Burkina-Faso and Mali, belonging to the three African races, and one Asian strain as control. Twenty accessions were resistant to the race A3. CAPS markers and "dot Blot" techniques were used to identify *xa5* and *Xa21* in *O. glaberrima* germplasm respectively. The results showed that these genes are not involved in the resistance provided by *O. glaberrima*. In order to map resistance genes in Asian cultivated rice *Oryza sativa*, the mapping population, comprising 178 recombinant lines, derived from the cross between IR64 and Azucena by "single Seed Descent" method, was used. The genetic map of the same population, saturated with 226 microsatellites markers, was also used. The composite interval mapping using WinQTLCartographer 2.5 and Qgene-4.3.0 software evidenced five QTLs controlling 10 to 37% of the phenotypical variation. These QTLs were different from those induced by Asian strains except that identified on Chromosome 11. The 17 known QTLs and 35 major resistance genes identified against Asia *Xoo* strains were remapped on Nipponbare physical map. Several colocalizations of QTLs/genes, common to African and Asian *Xoo* strains were highlighted on Chromosomes 1, 7, 10 and 11. Specific QTLs were located on Chromosomes 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 and 12. Segregation studies and bacterial growth curve showed that the QTLs of Chromosomes 7 and 11, controlling resistance to the African *Xoo* strains, were recessive, whereas the majority of the resistance genes to Asian strains are dominants.

In conclusion, our results showed that the Asian rice *Oryza sativa* has a wider genetic basis of resistance to African bacterial blight than the African cultivated rice *Oryza glaberrima* which was resistant to Malian strains only. Asian resistance genes are mostly dominant while the QTLs induced by African *Xoo* strains are recessive.

Key words: Rice, bacterial blight, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, mapping, resistance QTL and gene

Table des matières

Remerciements.....	i
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Abréviations.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiv
Introduction générale.....	1
Chapitre I.....	5
Revue de littérature.....	5
I- Le Riz.....	6
I.1- Origine et systématique.....	6
I.2- Importance et production.....	6
I.3- Domestication.....	9
I.4- Diversité génétique d' <i>Oryza sativa</i>	10
I.5- Diversité génétique d' <i>Oryza glaberrima</i>	11
I.6- Les avancées génomiques et ressources disponibles.....	11
I.7- Les différents types de rizicultures.....	14
I.8- Les contraintes liées à la riziculture.....	15
I.8.1- Facteurs abiotiques.....	15
I.8.2- Facteurs biotiques.....	16
II- Relation plante-pathogène.....	24
II-1 Résistance constitutive (passive).....	25
II-2 Résistance induite (active).....	25
II-2-1 Réponse d'hypersensibilité (Hypersensitive responses HR).....	26
II-2-2 Résistance locale acquise (Locally-acquired resistance ou LAR).....	26
II-2-3 Résistance systémique acquise (Systemic- acquired resistance or SAR).....	27

II-2-4 La reconnaissance de l'agent pathogène par les plantes.	27
II-3 Principes généraux des interactions moléculaires: le model zigzag	29
II-4 Les systèmes de sécrétion et les protéines effectrices	30
III- De la cartographie de locus à caractère quantitatif (QTL) à l'identification et validation de gènes.....	31
III-1 Détection et cartographie de QTL.....	32
III-1-1 Population de cartographie et phénotypage.....	32
III-1-2 Construction d'une carte génétique	34
III-1-3 Détection de QTL par les méthodes d'analyse classique	37
III-1-4 Détection de QTL par la génétique d'association.....	40
III-2 Identification des facteurs impliqués dans les QTLs	41
III-2-1 Approche génétique par utilisation de lignées quasi-isogéniques	41
III-2-2 Accès au contenu en gènes et identification de gènes candidats.....	43
III-2-3 Validation des gènes candidats.....	43
IV- Inventaire des gènes et QTLs de résistance préalablement identifiés contre les souches Asiatiques de <i>Xoo</i>	44
Chapitre II	50
Identification de sources de résistance aux souches africaines de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> chez le riz africain <i>Oryza glaberrima</i>	50
Résumé.....	51
I- Introduction	52
II- Matériels et méthodes.....	54
II-1 Matériels évalués.....	54
II-2 Inoculation et évaluation de la maladie.....	55
II-3 Dispositif expérimental et analyse de données	56
II-4 Détection des allèles de résistance xa5 et Xa21.....	57
III- Résultats	58
III-1 Identification de variétés d' <i>Oryza glaberrima</i> résistantes à...	58

la bactériose du riz	58
III-2 Virulence des souches de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .	60
III-3 La détection des allèles de résistance <i>xa5</i> et <i>Xa21</i> chez	63
<i>Oryza glaberrima</i>	63
V- Discussion	65
Conclusion	67
Chapitre III	73
Identification et cartographie de QTLs de résistance spécifiques aux souches africaines de <i>Xantomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	73
Résumé.....	74
I- Introduction	75
II-Matériels et méthodes.....	76
II-1 Identification et cartographie de QTLs de résistance aux souches Africaines de <i>Xoo</i>	76
II-1-1 Population de cartographie.	76
II-1-2 Ségrégation de la population de cartographie pour la résistance à la bactériose	76
II-1-3 Génotypage de la population de cartographie	76
II-1-4 Méthodes d'analyse QTLs.....	77
II-2- Interpolation des gènes et QTLs de résistance aux souches Asiatiques de <i>Xoo</i> sur la carte génétique IR64 x Azucena.	77
III- Résultats	77
III-1 La ségrégation de la population IR64 x Azucena pour la résistance à la bactériose.	77
III-2 Les analyses QTL	78
III-3 Répertoire des gènes et QTLs de résistance autrefois identifiés contre les souches Asiatiques de <i>Xoo</i>	79
IV- Discussion	83
Conclusion	86
Chapitre IV.....	95
Hérédité et cartographie fine des QTLs des chromosomes 7 et 11.	95
Résumé.....	96

I- Introduction	97
II- Matériel et méthodes.....	97
II-1 Dissection du QTL 7.....	97
II-1-1 Développement de populations de cartographie fine.....	97
II-1-2 Phénotypage des familles F ₃	98
II-1-3 Identification de marqueurs polymorphes et génotypage des familles F ₃	98
II-2 Analyse fine du QTL du chromosome 11	99
II-2-1 Validation de <i>Xa4</i> au locus du QTL 11	99
II-2-2 Cinétique de croissance bactérienne.....	100
II-2-3 Exploration d'un gène de sensibilité : le cas du gene Os11N3	101
III-Résultats	104
III-1 Dissection du QTL du chromosome 7.....	104
III-1-1 Héritéité du QTL.....	104
III-1-2 Identification de marqueurs de résistance	105
III-2 Analyse fine du QTL du chromosome 11	106
III-2-1 Validation de <i>Xa4</i> au locus du QTL	106
III-2-2 Héritéité du QTL.....	107
III-3 Cartographie du gène candidat au locus de ce QTL.....	107
III-3-1 Sélection de lignées recombinantes et taux de recombinaison.....	107
III-3-2 Position du nouveau gène putatif <i>xa/B3</i> par rapport à <i>Xa4</i>	107
III-4 Cinétique de croissance bactérienne.....	108
III-5 Exploration de gènes de sensibilité : le cas d'OS11N3.....	110
IV- Discussion	111
Conclusion	114
Chapitre V.....	116
Discussion générale.....	116
I- Les principaux résultats obtenus.....	117

II- Le choix d' <i>Oryza glaberrima</i> pour la recherche de source de résistance	118
III- <i>Oryza glaberrima</i> , une source de résistance à la bactériose? ...	120
IV- Identification de QTLs/gènes de résistance à la bactériose.....	122
IV-1 L'importance du matériel génétique utilisé dans lacartographie de QTLs	122
IV-2 Les différentes méthodes d'analyse influencent-elles les résultats ?	122
IV-3 Caractérisation de la résistance du riz asiatique <i>O. sativa</i> à la bactériose en Afrique.....	123
V- Les gènes de résistance aux souches asiatiques de Xoo peuvent-ils être efficaces dans la riziculture en Afrique?	124
VI- Déploiement de gènes de résistance au BB dans la riziculture africaine.	125
Chapitre V	127
Conclusion générale et perspectives	127
Références bibliographiques	131

Abréviations

AAD	Domaine Acide d'Activation de la transcription (Acidic Activation Domain)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ANOVA	Analysis of Variance
ARN	Acide Ribonucléique
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAI	Burkina ADRAO IRD
BB	Bacterial Blight
BC	Backcross
BGI	Beijing Genomics Institute
BGI-RIS	Beijing Genomics Institute Rice Information System
BLB	Bacterial Leaf Blight
BLS	Bacterial Leaf Streak
BLUE	Best Linear Unbiased Estimators
CFU	Colony Forming Unit
CSSL	Chromosome Segment Substitution Line
DH	Double Haploid
DL	Déséquilibre de Liaison
DRTF	Database of Rice Transcription Factors
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EPS	Exopolysaccharides
EST	Expressed Sequences Tags
ETI	Effector Triggered Immunity
ETS	Effector-Triggered Susceptibility
HIF	Heterogeneous Inbred Families
HR	Hypersensitive responses
Hrc	HR-conserved protein
Hrp	Hypersensitive Response and Pathogenicity
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
IL	Introgression Line
InDels	Insertion-Délétion
INE	Integrated rice genome Explorer
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
IRGC	International Rice Genebank Characterization
IRGSP	International Rice Genome Sequencing Project
IRRI	International Rice Research Institute
J C	Jesus Christ
LAR	Locally-Acquired Resistance
LL	Lesion Length

LOD	Logarithm of odds
LPS	Lipopolysaccharides
LRR	Leucine Rich Repeat
MAI	Mali ADRAO IRD
MAMPS	Microbe-Associated Molecular Patterns
NaCl	Chlorure de sodium
NAI	Niger ADRAO IRD
NaOH	Hydroxyde de sodium
NBS	Nucleotide Binding Site
NERICA	New Rice for Africa
NIL	Near Isogenic Line
NO	Oxyde nitrique
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PRRs	Pathogen Recognition Receptors
PSA	Peptone Sucrose Agar
PTI	PAMP-Triggered Immunity
QRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Locus
RADB	Rice Annotation Database
RAM	Riz Africain du Mali
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RAP-DB	The Rice Annotation Project-Database
RIL	Recombinant Inbred Line
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGA	Resistance genes Analogs
RiceGAAS	Rice Genome Automated Annotation System
ROS	Reactive Oxygen Species
RYMV	Rice Yellow Mottle Virus
SAM	Sélection Assistée par Marqueurs
SAR	Systemic-Acquired Resistance
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TAL	Transcription Activator Like
t-DNA	Target-Desoxyribonucleic Acid
TIGR	The Institute for Genomic Research
TILLING	Targeting Induced Local Lesions In Genomes
T3SS	Type III Secretion System
VL	Virulence Level
Xoo	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Xoc	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Différentes races de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> d'origine africaine identifiées en fonction de leur réaction après inoculation sur des lignées isogéniques IRBB de riz.....	21
Tableau I-2 : Les différents gènes de résistance aux souches asiatiques de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	48
Tableau II-1 : Caractéristiques des souches de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> utilisées et leurs réactions sur 107 accessions <i>O. glaberrima</i>	61
Tableau II-2: Liste des accessions d' <i>O. glaberrima</i> résistantes et sensibles aux différentes souches de <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	62
Tableau II-3: Différentes réactions induites par <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> sur les accessions d' <i>Oryza sativa</i>	61
Tableau II-4: Réaction d'un ensemble d'accessions d' <i>O. glaberrima</i> aux souches de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> et leurs génotypes aux loci des markers de <i>xa5</i> et <i>Xa2</i>	64
Tableau II-5: Données supplémentaires: Réactions provoquées par les souches de <i>Xoo</i> sur les accessions d' <i>Oryza glaberrima</i>	68
Tableau III-1: Caractéristiques des nouveaux QTLs de résistance aux souches africaines et asiatiques de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> qui sont cartographiés dans la population IR64 x Azucena population.....	79
Tableau III-2: Liste des gènes et QTLs de résistance identifiés contre les souches asiatiques de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	87
Tableau IV-1 : Génotype aux différents loci des QTL des chromosomes 1, 7 et 11, de la lignée recombinante SSD90 ayant servi à développer la population de cartographie fine.....	99

Tableau IV-2: Volumes d'ARN et de bleu de charge prélevés pour l'électrophorèse sur gel d'agarose en vue d'évaluer la quantité et la qualité des ARN totaux extraits.....	103
Tableau IV-3 : Traitement des ARN totaux par le DNase : mix utilisé pour obtenir 20 µl d'ARN.....	104
Tableau IV-4 : Séquences des amorces du gène constitutif actine et celles du gène de sensibilité Os11N3.....	105
Tableau IV-5 : Liste des 16 marqueurs polymorphes in silico entre IR64 et Azucena.....	106
Tableau IV-6 : Liste des marqueurs de l'intervalle de confiance du QTL du chromosome 7 montrant le marqueur RM125 non assigné au même groupe de liaison que les autres.....	107
Tableau IV-7 : Table de LOD Score d'assignation des marqueurs aux groupes de liaison.....	107
Tableau IV-8 : Carte génétique montrant la position du gène xa/B3 par rapport à Xa4.....	109

Liste des figures

Figure I-1: Distribution géographique des espèces du génome AA du genre <i>Oryza</i> et aires de domestication.....	8
Figure I-2 : Surface et Production mondiale de riz Paddy.....	8
Figure I-3 : Principales différences morphologiques entre <i>O. sativa</i> et <i>O. glaberrima</i>	12
Figure I-4: Espèce africaine de riz cultivé, <i>Oryza glaberrima</i>	12
Figure I-5 : Symptômes de la bactériose vasculaire du.....	18
Figure I-6 : Répartition géographique de la bactériose vasculaire du riz.....	19
Figure I-7 : <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i> en microscopie électronique.....	18
Figure I-8 : Le modèle en zig-zag illustrant l'interaction plante-pathogène.....	29
Figure I-9 : Diagramme des principaux types de populations de cartographie des espèces autogammes.....	33
Figure I-10 : Gels illustrant la différence entre marqueurs codominant et dominant dans cinq populations de cartographie (Collard et al. 2005).....	35
Figure I-11: Exemple de cartographie, par ANOVA, de 15 QTLs contrôlant le rendement et la résistance du riz au RSNV.....	38
Figure II-1: Origines géographiques et nombre des accessions d' <i>Oryza glaberrima</i> évaluées pour leur résistance aux souches africaines de <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	54
Figure II-2 : Inoculation par méthode de leaf-clipping (Kauffman H E et al. 1973).....	56
Figure II-3 : Différents types de réactions induites par les différentes souches MA11, BA13, BA14 et PXO86 de <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i> utilisées.....	59

Figure III-1 : Carte génétique IR64 x Azucena de tous les QTLs et gènes de résistance à la bactériose vasculaire du riz en Afrique et en Asie.....	80
Figure IV- 1 : QTL mis en évidence avec la souche Xoo PXO61, parfaitement superposé à ceux induits par les souches africaines.....	107
Figure IV- 2 : Croissance bactérienne douze jours après inoculation de la variété sensible IR24.....	110
Figure IV- 3 : Croissance bactérienne douze jours après inoculation de la lignée isogénique résistante IRBB4.....	110
Figure IV- 4 : Expression constitutive de l'actine.....	111
Figure IV- 5 : Expression induite du gène de sensibilité Os11N3.....	111
Figure IV- 6 : Lésion provoquée par la souche africaine BAI3 et la souche asiatique PXO61 sur la lignée isogénique résistante IRBB4.....	112

Introduction générale

Le riz, *Oryza spp*, est une culture céréalière d'importance mondiale. Il constitue, de nos jours, la base de l'alimentation des deux tiers de la population mondiale et la principale source de revenus pour près d'un milliard de personnes dont les femmes notamment. Il permet de satisfaire plus du quart des besoins nutritionnels de la population mondiale et constitue, comme le blé, l'une des céréales les plus. Dans la plupart des pays en développement, où 800 millions de personnes sont sous alimentées, le riz représente 27% de l'apport énergétique et 20% des protéines alimentaires. Avec la population mondiale sans cesse grandissante, Killigsworth projette, à l'horizon 2030, une augmentation de 75% des besoins alimentaires actuels de l'humanité. La culture du riz devra donc être l'un des maillons les plus importants des programmes de lutte contre la famine surtout en Afrique sub-saharienne où la production régionale ne couvre pas tous les besoins exprimés. L'amélioration de la production rizicole pourrait donc contribuer de façon significative, au niveau local et régional, à l'augmentation des revenus des familles, ainsi qu'à une meilleure sécurité alimentaire dans les régions pauvres (WARDA, 2000). Malheureusement, la production rizicole dans le monde en général et en Afrique en particulier est sujette à des contraintes aussi bien biotiques qu'abiotiques. Entre autres contraintes biotiques, nous avons les maladies d'origine bactérienne. Celle la plus répandue et la plus dévastatrice est la bactériose vasculaire ou brûlure bactérienne des feuilles (BLB ou BB) causée par la bactérie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Elle occasionne des pertes de production de 20 à 50% (Mew, 1987 ; Gnanamanickam *et al.*, 1999; Swamy *et al.*, 2006). La bactériose vasculaire a été signalée dans les années 80 au Mali, en Mauritanie, au Niger, au Nigéria, au Sénégal, au Cameroun (Buddenhagen *et al.*, 1979 ; Reckhaus, 1983 ; Reckhaus et Amadou, 1986) et plus récemment au Bénin et au Togo (Déwa *et al.*, 2011). Plusieurs méthodes de lutte ont été adoptées contre cette bactériose mais la plus efficace, de nos jours, est l'utilisation de variétés résistantes.

En Asie, de nombreux travaux ont été effectués sur la connaissance de l'agent pathogène, les mécanismes et la base génétique de la résistance du riz au pathogène et l'amélioration génétique de cette résistance chez certaines variétés élites. Ainsi, une trentaine de gènes de résistance ont été identifiés (Cheema *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2008; Korinsak *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2010; Ram *et al.*, 2010). *Xa1* (Yoshimura *et al.*, 1998), *Xa3* (Xiang *et al.*, 2006), *xa5* (Iyer et McCouch, 2004), *xa13* (Chu *et al.*, 2006), *Xa21* (Song *et al.*, 1995), *Xa26* (Sun *et al.*, 2004) et *Xa27* (Gu *et al.*, 2004) ont été clonés. Certains de ces gènes de résistance ont été même introgressés dans des variétés élites de l'Asie. C'est ainsi qu'en 1997, Huang et son équipe ont utilisé des outils moléculaires pour le pyramidage de quatre gènes de résistance (*Xa4*, *Xa5*, *Xa13* et *Xa21*) dans une variété élite.

Mais en Afrique, très peu de travaux ont été effectués sur le BLB. Quelques souches africaines de son agent causal *X. oryzae* ont été caractérisées. De

nouvelles prospections ont été effectuées dans quelques pays de l'Afrique de l'ouest et du centre notamment au Burkina, au Mali, au Niger et au Cameroun (Séré *et al.*, 2005) et plus récemment au Burkina, au Mali (Verdier *et al.* 2009, communication personnelle), au Bénin, en Gambie, en Guinée, au Nigéria (Onasanya *et al.*, 2009) et au Niger (Basso *et al.*, 2011). Les souches isolées ont été caractérisées grâce à des outils moléculaires (Gonzalez *et al.*, 2007). Cette caractérisation a montré que le génome africain de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* est différent du génome asiatique. Peut-il donc exister, chez le riz, les mêmes sources de résistance aux souches africaines et asiatiques de *Xoo*? Les mêmes gènes de résistance peuvent-ils être efficaces contre ces souches africaines et asiatiques de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*? Si non, il est donc urgent d'identifier de nouveaux gènes de résistance spécifiques aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, de les caractériser afin de les utiliser pour améliorer des variétés élites de riz en Afrique de l'ouest.

Les présents travaux, fruits de la collaboration entre le centre du riz pour l'Afrique AfricaRice, l'université d'Abomey-Calavi, et les UMR « Diversité, Adaptation et Développement des Plantes » et « Résistance des Plantes aux Bioagresseurs » de l'Institut de Recherche pour le Développement IRD de Montpellier/France se justifient par :

- L'importance économique de cette pathologie qui provoque d'énormes pertes de récolte ;
- La nécessité de développer des cultivars possédant un bon niveau de résistance à cette bactériose.

Le sujet proposé porte sur l'étude des bases génétiques et la cartographie de la résistance au BLB et participera à une meilleure connaissance des gènes impliqués dans cette résistance afin de mieux les utiliser en sélection. L'objectif général de ce travail est d'augmenter la productivité rizicole en Afrique au sud du Sahara en développant des variétés de riz locales ayant une résistance durable à la bactériose.

Le chapitre 1 de cette thèse présente, dans sa première partie, les connaissances générales sur le riz, sa domestication et sa distribution géographique, les avancées génomiques et les contraintes liées à sa production notamment les maladies dont l'une des plus importantes est la bactériose vasculaire « bacterial leaf blight ». La deuxième partie de ce chapitre est consacrée aux interactions plante-microorganisme avec pour modèle riz - *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dans lequel les gènes d'virulence de l'agent pathogène et les gènes de résistance du riz qui y sont impliqués ont été répertoriés. La troisième partie met en évidence les différentes étapes de la détection des QTLs à l'identification des gènes. Elle a été publiée dans le journal scientifique de l'Université de Lomé. Le chapitre 2 portant, d'une part, sur l'identification de source de résistance aux souches africaines de *Xoo* chez le riz cultivé africain *Oryza glaberrima*, et d'autre part, sur l'exploration des gènes de résistance *xa5* et *Xa21* chez

O. glaberrima a été publié dans le journal « *Plant Disease* ». Quant au chapitre 3, sa première partie porte sur l'identification et la cartographie de QTLs de résistance chez le riz cultivé asiatique *Oryza sativa*. Sa deuxième partie a été consacrée à l'interpolation de tous les gènes et QTLs de résistance au BLB connus, sur une même carte Nipponbare en vue de mettre en évidence les gènes communs aux souches africaines et asiatiques de Xoo et ceux qui leurs sont spécifiques. Ce chapitre aussi rédigé sous forme d'article a été soumis à la revue « *Rice* ». Les QTLs identifiés dans la première partie du chapitre 3 ont fait l'objet d'une cartographie fine dans le chapitre 4. Enfin, une discussion générale des principaux résultats obtenus a été faite dans le chapitre 5. Outre les trois articles produits lors de cette thèse, les différents résultats ont fait l'objet de communications orales lors de la IX^e rencontre internationale plante-bactérie d'Aussois/France en janvier 2010, les XII^e journées scientifiques du réseau BIOVEG/AUF à Cluj/Roumanie en septembre 2010, à un séminaire Genetrop/IRD/Montpellier en Juin 2011 et à la rencontre tenue à Bobo-Dioulasso du 25 au 27 Juillet 2011 dans le cadre du projet trilatéral "Promouvoir une production rizicole stable en Afrique Sub-saharienne par désarmement bactérien". Cinq posters ont été présentés respectivement à la réunion annuelle du « Generation Challenge Programme » (Benoni/Afrique du sud, 2007), à la 2nde conférence internationale sur la bactériose du riz (Nanjing en Chine, 2008), à Rice congress organisé par l'Intitut International de Recherche en Riziculture, IRRI (Philippines 2009), à la fête de la science organisée par l'Université de Montpellier 2 en 2009, aux IX^e Rencontres internationales Plantes-bactéries (Aussois, France 2010), à AfricaRice congress (Mali, 2010). Le dernier ayant été primé en Juin 2010 au concours de poster organisé conjointement par la coopération française, la Direction Nationale de la Recherche Scientifique et Technique du Bénin (DNRST), l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et le Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD).

Chapitre I

Revue de littérature

I- Le Riz

I.1- Origine et systématique

Le riz est une céréale appartenant à l'embranchement des Angiospermes, la classe des monocotylédones, la sous-classe des commeliniideae, l'ordre des poales, la famille des poaceae, au genre *Oryza* et à l'espèce *Oryza* spp. Il comporte 22 espèces diploïdes ou tétraploïdes ($2n = 12, 24, 36, 48$), de génomes différents (AA, BB, CC, DD, EE, BBCC, CCDD, HHJJ) selon que le type soit sauvage ou cultivé avec plus de 2000 variétés cultivées à travers le monde. Seules deux espèces diploïdes ($2n = 24$) de génome AA sont cultivées. Ce sont des espèces annuelles à autogamie prépondérante. Il s'agit de *Oryza sativa*, et *Oryza glaberrima*. *Oryza sativa*, originaire d'Asie présente une grande diversité de formes classées en deux sous-espèces *indica* et *japonica*. La sous-espèce *indica* est originaire de l'Asie tropicale (Inde) et se caractérise par un fort tallage et des grains longs et fins tandis que *japonica*, originaire de la zone tempérée et subtropicale de l'Asie (Chine), a un tallage moyen et des grains courts et ronds. Ces deux sous-espèces sont largement cultivées à travers le monde. La deuxième espèce, *Oryza glaberrima* est originaire du delta centre du Niger d'où elle s'est étendue vers les côtes de l'Afrique occidentale, notamment en Gambie, en Casamance et dans le bassin de Sokoto (Figure I-1).

Alors que *O. sativa* est largement cultivé sur tous les continents grâce à sa plasticité écologique, *O. glaberrima* est endémique à l'Afrique. Il est cultivé dans une zone qui s'étend du delta du fleuve Sénégal jusqu'au lac Tchad. Son aire de répartition est limitée au sud-est par les bassins de la Bénoué, du Logone et du Chari, mais on l'a aussi observé sur les îles de Pemba et Zanzibar (Tanzanie). Les régions où le riz africain est cultivé le plus intensément sont les plaines inondables du nord du Nigeria, le delta intérieur du Niger au Mali, certaines régions de Sierra Leone, et les collines situées à la frontière entre le Ghana et le Togo. Il a été introduit dans le Nouveau Monde, où il est rarement cultivé de nos jours (Brésil, Guyana, El Salvador et Panama). On estime que le riz africain représente moins de 20% de la superficie totale de riz en Afrique de l'Ouest où il est le plus répandu. L'espèce *O. glaberrima* se distingue facilement d'*O. sativa* par une ligule courte et par un panicule dressé alors que le riz asiatique à une longue ligule avec un panicule légèrement retombant à maturité.

I.2- Importance et production

Le riz constitue l'une des cultures céréalières les plus importantes du monde. Il constitue la source d'alimentation de base de plus de la moitié de la population mondiale (Khush, 2005). Il représente 30% de la production céréalière mondiale avec plus de 150 millions d'hectares de surface exploitée. Selon les statistiques de la FAO (2010), la production mondiale

du riz paddy a connu une augmentation d'environ 18% ces dix dernières années. Elle est passée de 600 millions de tonnes en 2001 à 710 millions en 2010 (Figure I-2). La production asiatique seule s'élève à 643 millions de tonnes (90%) provenant notamment de l'Inde, des Philippines, du Sri Lanka, de la Thaïlande, du Bangladesh, de la Chine continentale, de l'Indonésie et du Myanmar ; la production de la Taïwan et des Corée étant en baisse. Malgré une augmentation de 4% par rapport à 2009, la production africaine, de 24,8 millions de tonnes, demeure très faible. Elle provient notamment du Mali, du Nigeria et de la Sierra Leone. Cette augmentation est due aux prix favorables sur le marché ainsi que des mesures d'incitations du secteur. Des reprises de la production sont également notées en Égypte et en Tanzanie, tandis que des conditions météorologiques défavorables ont entraîné des baisses à Madagascar, au Malawi et au Mozambique. L'Amérique latine et les Caraïbes ont enregistré une production de 26,9 millions de tonnes ce qui représente une baisse de 3% par rapport à 2009. La baisse résulterait de la diminution de production dans les pays d'Amérique du Sud, principalement au Brésil, mais aussi en Bolivie, au Chili et en Uruguay, qui dépassent les augmentations prévues pour l'Argentine, la Colombie, l'Équateur et le Vénézuéla. La République Dominicaine et le Cuba en Amérique centrale, ont enregistré des récoltes plus abondantes. Dans les autres régions comme l'Australie, l'UE-27, la Russie et les États-Unis, la production est en hausse. La consommation mondiale de riz en 2010 est passée à 454 millions de tonnes (soit une augmentation de 2,1% par rapport à 2009) dont 388 millions destinés à la consommation alimentaire. Selon les estimations actuelles, la consommation mondiale de riz par habitant en 2010 est passée de 56,5 kilos par personne en 2009 à 56,8 kilos, traduisant une augmentation de la consommation moyenne de riz dans les pays en développement ainsi que dans les pays développés.

Outre dans l'alimentation humaine, le riz et ses dérivés sont utilisés pour la fabrication de la paille et des cordes, du papier, de matériel d'emballage. Il est aussi utilisé dans les cosmétiques. Dans certaines régions de l'Afrique de l'ouest, le riz est utilisé aussi dans les cérémonies traditionnelles et rituelles (région de Casamance au sud du Sénégal). Les plus fines parties du son et des brisures sont données comme nourriture aux volailles et au bétail.

Pour l'Afrique de façon générale, la production d'*O. glaberrima* est passée de 8 millions en 1980 à plus de 18 millions de tonnes en 2005.

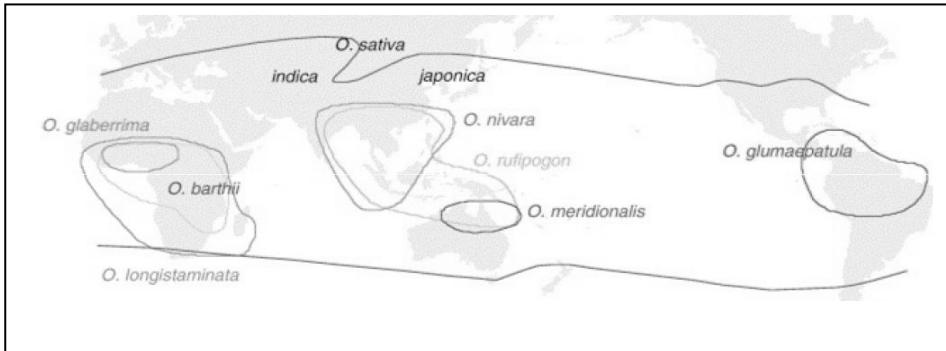


Figure I-1: Distribution géographique des espèces du génome AA du genre *Oryza* et aires de domestication. (Ashikari et Matsuoka 2006)

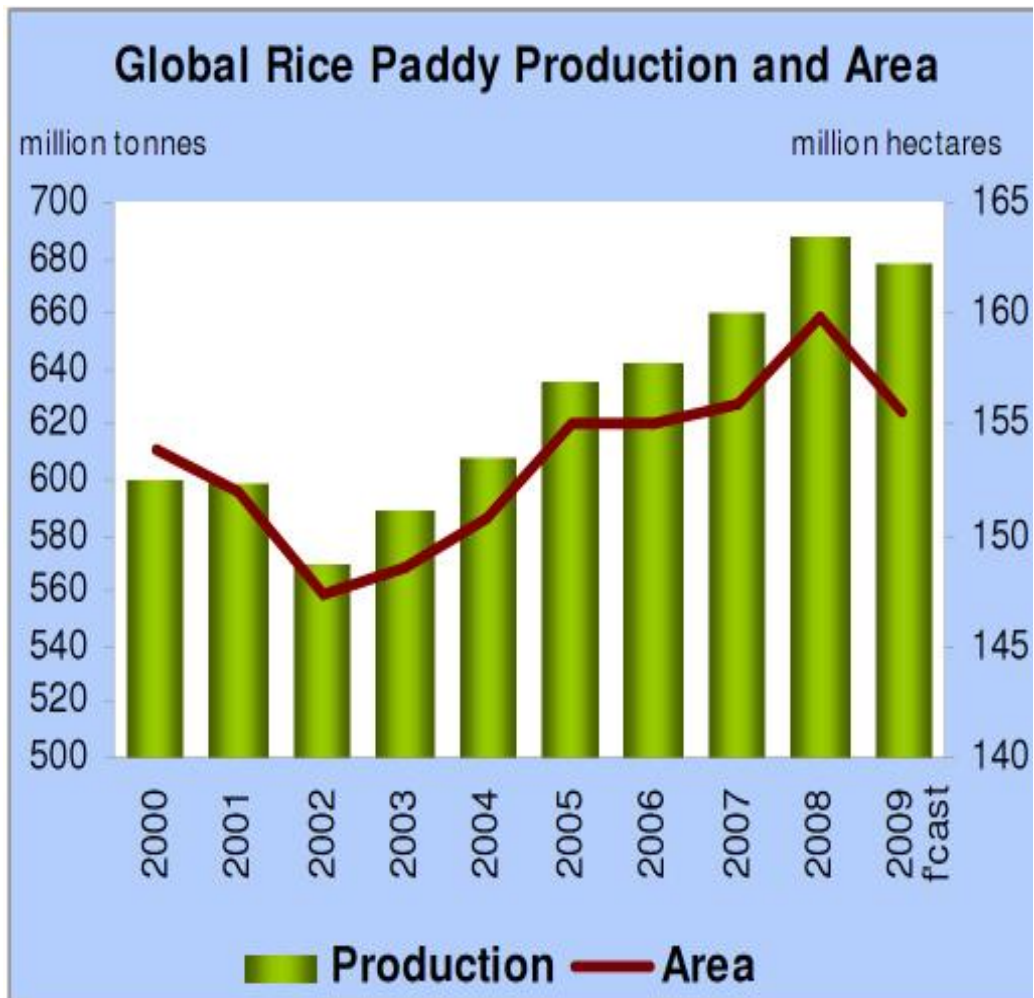


Figure I-2 : Surface et Production mondiale de riz Paddy FAO (2009)

I.3- Domestication

Le genre *Oryza* est subdivisé en 4 complexes : *O. sativa*, *O. officinalis*, *O. ridelyi* et *O. granulata*. Le complexe *Oryza sativa* comporte deux espèces domestiquées à savoir *O. sativa* et *O. glaberrima* et 6 sauvages diploïdes : *O. rufipogon* (Asie et en Océanie), *O. nivara*, *O. barthii* (Afrique de l'ouest), *O. longistaminata* (toute l'Afrique), *O. meridionalis* (originaire d'Australie) et *O. glumepatula* (Amérique Centrale et sud). *Oryza glaberrima* a été domestiqué à partir de *O. barthii* anciennement appelé *O. breviligulata* alors que *O. sativa* l'a été à partir de *O. rufipogon* (Vaughan *et al.*, 2008). *O. sativa* aurait été domestiqué au moins deux fois : *O. sativa japonica*, domestiqué dans la vallée du Yangtse au sud de la Chine et *O. sativa indica* développé dans l'est de l'Inde ou l'Indonésie. L'ancêtre commun leur ayant donné naissance est *O. rufipogon*, une espèce complexe qui comporte un continuum de formes annuelles, intermédiaires et pérennes et de formes autogames, intermédiaires et allogames (Second, 1985). *O. rufipogon* a ensuite migré vers l'Afrique. Les formes pérennes seraient à l'origine d'*O. longistaminata*, et les formes annuelles donnèrent *O. barthii* dont est dérivé *O. glaberrima*. Les animaux y compris l'homme constituent le facteur majeur dans la diffusion des espèces (Vaughan *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que *O. japonica* a été la première espèce domestiquée. C'est le cas de l'étude du radiocarbone sur des résidus de plantes (appelés *phytoliths* par les archéologues). En effet, ces *phytoliths* identifiés dans les dépôts de sédiments Diaotonghuan Cave, situé à proximité du lac Poyang dans la vallée du fleuve Yangtse, datent la domestication de 10000-9000 avant notre ère. D'autres tests de sédiments ont révélé des résidus de plantes de riz présents dans la vallée 12820 ans avant Jésus Christ (Fuller *et al.*, 2007 ; Zheng *et al.*, 2007). Plusieurs faits suggèrent que *O. glaberrima* est d'origine africaine. Les archéologues ont trouvés des impressions céramiques de grains de riz datant de 1800 à 800 avant J-C dans Ganjigana situé dans le nord-est du Nigeria. *Oryza glaberrima* a été domestiqué à partir de son ancêtre sauvage *O. barthii* en Afrique de l'Ouest dans le Delta du fleuve Niger au Mali environ 1500 ans av. J-C (Porteres, 1962). L'origine unique de domestication d'*O. glaberrima* à partir d'*O. barthii* a été confirmée par l'investigation de 14 gènes nucléaires dans une collection d'*O. glaberrima* et d'*O. barthii* qui ont montré un niveau de diversité nucléotidique très faible chez les deux espèces (Li *et al.*, 2011). *O. glaberrima* n'a pas connu une distribution mondiale comme l'espèce asiatique, elle est restée limitée exclusivement à Afrique. Sa culture est restreinte à une zone qui s'étend du Sénégal à l'Ouest jusqu'au lac Tchad à l'Est et limitée au Sud par la côte atlantique. *Oryza glaberrima* a néanmoins été signalée dans certaines rizières des îles tanzaniennes, de Zanzibar et de Pemba.

I.4- Diversité génétique d'*Oryza sativa*

Oryza sativa a une base génétique très large avec plus de 150000 variétés cultivées à travers le monde. La banque de gènes de l'IRRI (International Rice Research Institute, Manille, Philippines) conserve plus de 100000 accessions de riz. Cette diversité est créée grâce à des croisements naturels entre *O. sativa* et les formes sauvages ou adventices de *rufipogon* ou des croisements intra-spécifiques *sativa-sativa* combinés à la sélection naturelle et humaine depuis la domestication (Khush, 1987). Les préférences des consommateurs ont conduit à la culture d'un grand nombre de variétés souvent spécifiques aux différentes régions ou localités. Cette diversité est très fortement structurée avec d'un côté le groupe *indica* et de l'autre le groupe *japonica*. Des résultats récents basés sur l'évolution des rétro-transposons montrent que les génomes *indica* et *japonica* ont divergé il y a au moins 200000 ans, une séparation bien antérieure à la domestication et qui remonte probablement à l'apparition de la barrière himalayenne (Vitte *et al.*, 2004). Ces deux groupes se distinguent nettement par des marqueurs agro-morphologiques, biochimiques et moléculaires. Plusieurs types de marqueurs moléculaires sont disponibles pour évaluer le degré de variation génétique du riz. Il s'agit des marqueurs RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Virk, 1995), AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.*, 1995), SSR (simple sequence repeats) (de Oliveira Borba, 2009) et plus récemment les SNP (single nucleotide polymorphisms) (McNally *et al.*, 2009). Ces auteurs ont construit une base de données (www.oryzaSNP.org) avec plus d'une vingtaine de variétés de riz afin d'analyser la variation génétique au niveau des SNPs. Cette variation a été déterminée sur 100 Mb du génome du riz. Ils ont caractérisé un total de 159478 SNPs de haute qualité répartis sur l'ensemble des génomes de la base de données. A l'aide de marqueurs RFLPs, l'équipe de Lu B. R. a mis en évidence une nette séparation des génomes *indica* et *japonica* (Lu *et al.*, 2002). En utilisant 169 SSRs nucléaires, Garris *et al.* (2005) ont étudié la diversité de 234 accessions d'*O. sativa*. Les résultats montrent que la plupart des accessions se répartissent dans l'un des cinq groupes correspondant à *indica*, *aus*, aromatiques, *japonica* tempéré et *japonica* tropical. Par ailleurs, les génomes d'*O. indica* sont très diversifiés par rapport aux autres groupes. Les groupes des *japonica* tempéré et tropical sont génétiquement très liés et présentent une diversité génétique plus faible que le groupe constitué par *indica*. Plus récemment encore, des milliers de marqueurs microsatellites SSRs dans le génome d'*indica* et de *japonica* ont été identifiés. Sur la base de ces SSRs, une base de données publique a été construite (www.wigs.zju.edu.cn/achievement/polySSR). La longueur moyenne des SSRs dans les génomes *indica* et *japonica* est similaire avec 17,4 pb à 17,8 pb alors que la distance moyenne entre les SSRs est plus faible dans le génome *indica* (3,6 kb) que dans le génome *japonica* (3,7

kb). Un tiers des SSRs sont polymorphes entre les deux sous-espèces. L'utilisation de ces marqueurs moléculaires de types SSR rend plus efficace la sélection assistée par marqueurs.

I.5- Diversité génétique d'*Oryza glaberrima*

O. glaberrima possède une diversité génétique très faible (Second, 1982) par rapport à *O. sativa*. Néanmoins, les études de diversité menées par Semon et al. (2005) en criblant 198 accessions de *O. glaberrima* à l'aide de 93 marqueurs microsatellites ont montré l'existence de cinq sous-groupes. Ces sous-groupes reflètent la spécialisation écologique de l'espèce *O. glaberrima*. Malgré quelques différences telles que le niveau du tallage, la largeur des feuilles, entre les accessions *O. glaberrima* de culture aquatique et de culture pluviale, on n'observe pas dans cette espèce des différenciations morphologiques aussi nettes que dans l'espèce *O. sativa*. Elle se distingue du riz asiatique par sa courte ligule, le port dressé de sa panicule peu ramifiée et la couleur rouge du péricarpe (Figures I-3 & 4).

I.6- Les avancées génomiques et ressources disponibles

Le riz constitue un génome modèle pour les monocotylédones, tout comme l'arabette (*Arabidopsis thaliana*) pour les dicotylédones. Les avancées génomiques portent non seulement sur les différentes structures du génome mais aussi ses fonctions. En effet, le séquençage des deux sous-espèces indica et japonica (Goff *et al.*, 2002 ; Yu *et al.*, 2002 ; Yu *et al.*, 2005) a apporté un nouvel éclairage sur la structure du génome et de ces variations et facilite l'étude de l'évolution des génomes et de la fonction des gènes et de leur expression. L'amélioration génétique des plantes nécessite l'inventaire des gènes et de leur fonction. L'étude du génome de plantes modèles permet, en effet, d'identifier des gènes impliqués dans les fonctions d'intérêts en utilisant des outils d'analyse fine d'expression des gènes comme les puces à ADN ou la QRT-PCR. Le consortium public international IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) a séquencé complètement le génome des deux sous-espèces indica et japonica (Project IRGS, 2005). En 2002, l'équipe de séquençage du génome du riz de l'Institut de Recherche Génomique (TIGR) a publié l'assemblage des douze chromosomes. L'institut génomique Beijing (BGI) a décodé le génome d'*O. indica* et Syngenta a décrypté celui d'*O. japonica* (Goff *et al.*, 2002). Les cartes génétiques et les techniques de transformation génétique efficaces qui font du riz une plante facile à transformer sont autant de ressources disponibles pour l'approche génomique.

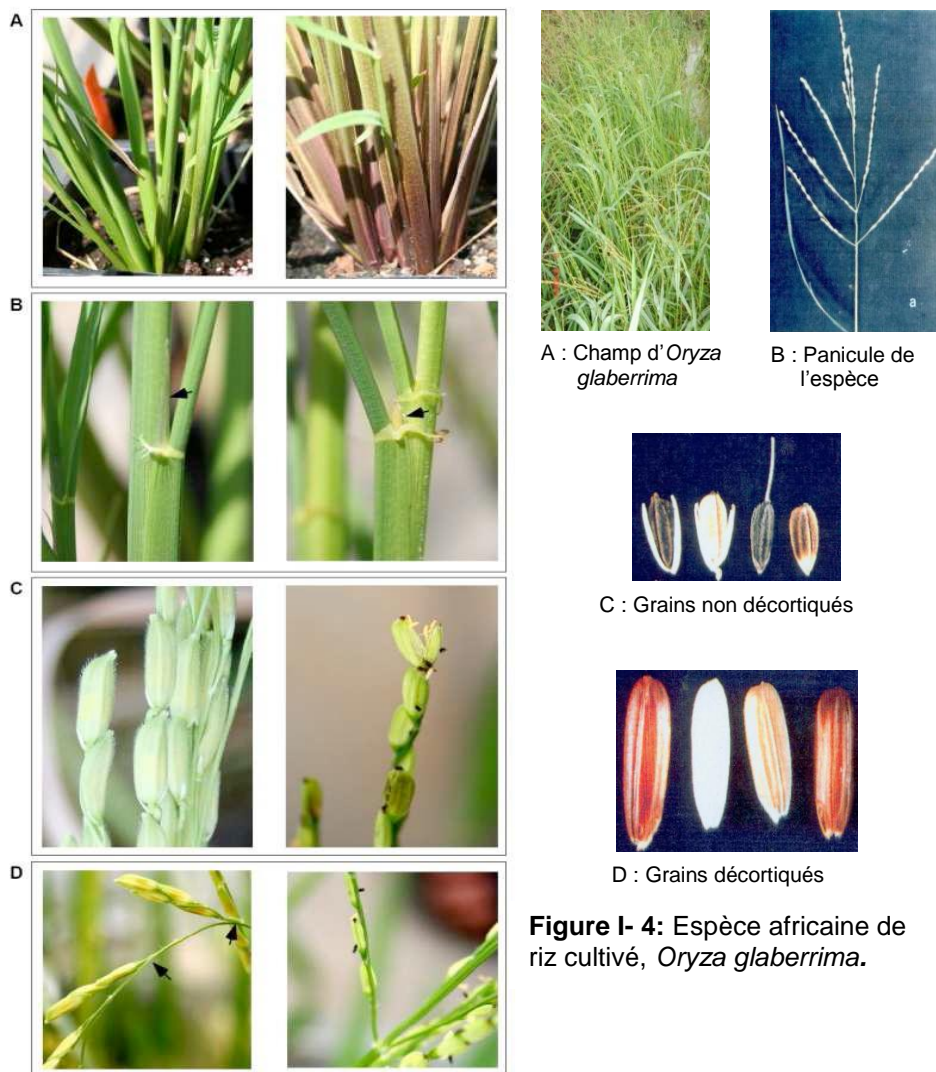


Figure I- 4: Espèce africaine de riz cultivé, *Oryza glaberrima*.

Figure I-3 : Principales différences morphologiques entre *O. sativa* (à gauche) et *O. glaberrima* (à droite). A : coloration du talle B : Taille et forme de la ligule, large et aristée pour *O. sativa*, courte et tronquée pour *O. glaberrima* C : pilosité des glumelles D : ramifications secondaires de la panicule.

La disponibilité de la séquence de chacune des deux sous-espèces indica et japonica permet de réaliser des études de génomique comparative. Sur la base de l'annotation actuelle du génome, on estime à 42653 le nombre de gènes non transposables chez le riz (Yu *et al.*, 2005) parmi lesquels 31439 ont une fonction connue dont 30192 codent potentiellement pour des protéines. De plus, 239 petits ARNs, correspondant à 61 familles, ont été identifiés. Les petits ARNs sont des ARNs simple brin faits de 21 nucléotides et connus pour leur rôle important dans la régulation des gènes eucaryotes (Jones-Rhoades *et al.*, 2006) et la défense de la plante contre les infections microbiennes. Actuellement plus de deux millions d'ESTs (Expressed Sequences Tags) sont disponibles dans diverses bases de données du riz (<http://oxfordjournals.org/nar/database/subcat/13/40>). Ces bases de données sont utiles pour plusieurs études. Elles peuvent être utilisées pour:

- *l'annotation du génome du riz: c'est le cas de MOsDB, RADB, BGI-RISe, RAP-DB, INE, RiceGAAS, rice pipeline, etc.

- *l'analyse des facteurs de transcription (DRTF) ou de transposons (RetrOryza)

- *effectuer des études de génomique comparative avec d'autres plantes (GreenPhylDB). En effet, une analyse génomique comparative à grande échelle a été effectuée entre le riz et différentes espèces de plantes y compris *Arabidopsis thaliana*; *Populus trichocarpa* (le peuplier), *Zea mays* (maïs) et *Sorghum bicolor* (sorgho) disposant de larges données génomiques et transcriptomiques, et les transcripts de 400 autres espèces végétales. Cette étude a pour but de déterminer l'utilité des séquences inter-espèces et de réaliser l'annotation structurale et fonctionnelle du génome du riz (Zhu et Buell, 2007).

- *l'analyse de QTLs (plantQTL-GE, et Rice Gene Thresher)

- *la génétique inverse : c'est le cas de Orygenes DB (Droc *et al.*, 2006) rassemblant les données de séquences de riz et *Arabidopsis* provenant de différentes sources telles que TIGR, IRGSP, Génoplante, TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource) et disponible sur la plateforme (<http://orygenesdb.cirad.fr/>)

D'autres ressources disponibles sont les mutants qui permettent de déterminer la fonction des gènes. En effet, plusieurs programmes de génomique fonctionnelle ont été développés chez *O. sativa* et ont abouti à la création de lignées d'insertion/délétion obtenues soit par traitement chimique ou mutagenèse (EMS, dioxybutane) (Wu *et al.*, 2005), soit par transposon t-DNA, transposons hétérologues, et rétrotransposon Tos17 (Hirochika *et al.*, 2004 ; An *et al.*, 2005 ; Kumar *et al.*, 2005 ; van Enckevort *et al.*, 2005). Une collection de lignées d'insertion T-DNA a été produite par un consortium français, Génoplante (http://genoplante-info.infobiogen.fr/Oryza_TagLine/). Environ 500000 lignées mutantes sont disponibles pour la recherche. Si les insertions sont uniformément réparties

dans le génome, 99% des gènes de riz devraient présenter une insertion (Jung *et al.*, 2008).

En plus des ressources disponibles, des techniques de criblage à grande échelle des gènes exprimés sont mises au point. Il s'agit des puces à ADN qui permettent d'analyser plusieurs milliers de gènes simultanément. Cette technique permet d'accéder aux différents profils ou clusters d'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress abiotique ou biotique (Ito, 2006 ; Lian *et al.*, 2006 ; Guidot *et al.*, 2007 ; Seo *et al.*, 2008). Elle est aussi utilisée pour des études de polymorphisme à l'échelle génomique et permet d'identifier des mutations (Borevitz *et al.*, 2007). Un total de 33882 gènes du riz ont été validés par cette méthode de caractérisation des ARN transcrits (Jung *et al.*, 2008). Plusieurs plateformes « puces à ADN » ont été construites pour les deux sous-espèces indica et sativa de riz (<http://www.ricearray.org>). L'université de Californie-Davis appuyée par la National Science Foundation (NSF) aux États-Unis a développé une puce à ADN de 45k avec 61419 gènes. L'intégration de données provenant de diverses approches transcriptomiques, protéomiques, métaboliques et informatiques est nécessaire pour comprendre la fonction des gènes et la régulation des régions non-codantes ainsi que d'autres nouveaux gènes ou les régions du génome pauvrement annotées (Jung *et al.*, 2008).

I.7- Les différents types de rizicultures

Grâce à la très grande diversité morpho-physiologique de ses écotypes, le riz est cultivé dans des conditions écologiques très variées allant du pluvial strict au type inondé où la lame d'eau peut atteindre 5m. Il s'agit de la riziculture pluviale stricte, de la riziculture irriguée, de la riziculture de bas-fonds et de la riziculture de mangrove.

La riziculture pluviale stricte est le type de riziculture pour lequel l'alimentation en eau durant le cycle de développement est assurée uniquement par les eaux de pluies. Elle est pratiquée sur des sols bien drainés et ayant une bonne capacité de rétention en eau. Elle est soumise aux aléas climatiques et son rendement plus incertain que celui de la riziculture irriguée qui est pratiquée sur les périmètres aménagés avec maîtrise partielle ou totale de l'eau. La riziculture irriguée avec maîtrise de l'eau, représente environ 55 % du total des surfaces cultivées. Elle est de loin, la plus pratiquée dans le monde avec environ 80 millions d'hectares. Le rendement moyen est le plus élevé de tous les écosystèmes, environ 4,5 tonnes à l'hectare ; et c'est l'écosystème qui contribue ainsi le plus, à la production mondiale. Dans ce cas, l'eau est parfaitement maîtrisée grâce à des ouvrages hydrauliques qui assurent l'irrigation durant toute l'année et empêchent des inondations intempestives. La riziculture irriguée sans maîtrise de l'eau représente 22,5 % des surfaces rizicoles en Afrique. Dans ce cas, l'agriculteur n'exerce aucun contrôle sur l'alimentation hydrique du

riz qui est assurée par les eaux de pluie ou par la crue d'un fleuve dans une pleine inondable.

Situées dans les zones basses du paysage, les bas-fonds sont les axes de convergence préférentiels des eaux de surface, des écoulements hypodermiques et des nappes phréatiques. Cette concentration des eaux provenant des versants fait que le risque de stress hydrique pour les cultures est faible dans ces milieux à sols hydromorphes et chimiquement riches.

La mangrove, quant à elle, est un type particulier de végétation située dans les parties basses des estuaires des fleuves ou sur les côtes. Elle est composée essentiellement de palétuviers. Envahie périodiquement par de l'eau salée, la mangrove présente un certain nombre de problèmes très spécifiques que sont la salinité et l'acidification du sol d'où la nécessité d'y cultiver des variétés de riz tolérant le sel. La riziculture de mangrove représente environ 10% des surfaces rizicoles en Afrique.

I.8- Les contraintes liées à la riziculture

La production de riz a doublé ces trente dernières années grâce à l'introduction de variétés à haut rendement et l'adoption de nouvelles pratiques culturales. Cependant, des efforts restent à faire pour faire face aux changements climatiques, aux maladies du riz, aux insectes et à l'augmentation rapide de la population humaine dont les besoins sont sans cesse croissants. Le changement climatique global a des conséquences potentiellement graves sur la production de riz. Les conditions de culture de riz se détériorent dans de nombreuses régions en particulier en Afrique.

I.8.1- Facteurs abiotiques

Le manque d'approvisionnement adéquat en eau est la principale contrainte de la riziculture. La croissance du riz nécessite beaucoup d'eau, soit six fois plus que celle du blé. Ce besoin d'eau est plus exprimé en Asie où la riziculture est majoritairement de type inondé. Le manque d'eau pourrait avoir comme conséquence directe la baisse de rendement et une qualité médiocre des grains. La salinité des sols, leur acidité, la toxicité ferreuse et alumineuse et la carence en phosphore et zinc sont autant de facteurs abiotiques qui entravent la production rizicole. Malheureusement, il n'est pas simple de résoudre le problème de l'indisponibilité d'eau puisque l'agriculture a déjà consommé une énorme quantité d'eau. En Europe, environ 40% de l'eau a été utilisée dans l'agriculture contre 50% en Amérique du Nord et 85% en Asie. Pour faire face à ce manque d'eau, le développement de variétés de riz résistantes à la sécheresse et la mise au point de systèmes d'approvisionnement en eau peu coûteux sont indispensables. La température est aussi un autre facteur qui influence la production de riz. Le riz est davantage adapté aux conditions subtropicales

humides. Ainsi, la baisse soudaine de la température ou du changement irrégulier de saison peut entraîner une baisse drastique de rendement. En Asie du sud, la production rizicole est grandement influencée par les variations des minima et maxima de températures journalières et le rayonnement solaire. Alors que les minima réduisent le rendement, les maxima, au contraire, l'augmentent. En combinant les données climatiques et de rendement dans six principaux pays producteurs de riz dans la région, Welch et son équipe en 2010 ont montré que la production du riz sera influencée de façon drastique par les changements climatiques dans les prochaines décennies.

I.8.2- Facteurs biotiques

De multiples facteurs biotiques entravent la production de riz. Les parasites animaux (insectes, nématodes, oiseaux), les maladies, et les mauvaises herbes sont responsables des pertes de production de 25 à 45% en Asie tropicale et subtropicale et en Afrique. Les maladies constituent les facteurs biotiques majeurs influençant la production rizicole. Certaines d'entre elles occasionnent des pertes considérables de rendement, mettant en mal les économies locales. Les plus importantes sont la pyriculariose et le flétrissement bactérien largement répandus dans toutes les zones de production de riz au monde, et la panachure jaune du riz, endémique à l'Afrique. D'autres maladies non moins importantes comme la ceccydomyie de galle, les foreurs de tige, menacent également la production rizicole. De nouvelles maladies virale, fongique et bactérienne émergent en Asie et en Amérique latine notamment *Burkholderia glumae*.

I.8.2.1- La pyriculariose

C'est la maladie du riz la plus répandue causant d'énormes pertes chaque année dans plus de 85 pays. Elle a été signalée la première fois en Asie il y a environ 300 ans. Les pertes mondiales de rendement engendrées sont de l'ordre de 157 millions de tonnes entre 1975 et 1990. L'agent pathogène de la pyriculariose est le champignon *Magnaporthe grisea*. Il infecte toutes les parties aériennes du riz, principalement les feuilles, occasionnant des lésions grises et blanches réduisant ainsi la photosynthèse et aussi le rendement. L'infection des panicules pourrait causer la mort de la plante avant que les grains soient remplis. La pyriculariose est davantage adaptée aux régions tropicales et humides. L'utilisation excessive de l'azote favorise l'infection (Talbot, 2003). Une fois les feuilles sont infectées, l'agent pathogène produit rapidement des spores dont la dissémination sur d'autres plantes est assurée par le vent ou la pluie. En dépit du strict contrôle et des mesures de quarantaine prises, la transmission de la maladie est difficile à maîtriser. C'est ainsi qu'elle a été finalement introduite

en Amérique (Lozano, 1977). Trente cinq QTL et plus de quatre vingt gènes de résistance à la pyriculariose ont été identifiés dont douze ont été clonés et utilisés pour l'amélioration de certaines variétés de riz pour la résistance (Jia *et al.*, 2009).

I.8.2.2- La panachure jaune du riz

Signalée pour la première fois en 1966 au Kenya, cette maladie causée par le virus de la panachure jaune du riz, RYMV (Rice Yellow Mottle Virus), est l'une des plus dévastatrices affectant le riz irrigué en Afrique et au Madagascar (Abubakar *et al.*, 2003 ; Kouassi *et al.*, 2005). Le virus appartient au genre Sobemovirus. De nos jours, il est présent dans tous les pays ouest et centrafricains particulièrement au Burkina Faso, en Côte d'Ivoire, en Guinée, au Mali au Niger, et au Bénin. Il occasionne des pertes de rendement d'environ de 64-100% au Mali et de 58-68% au Niger (WARDA, 2000). La maladie est transmise à la plante par un vecteur, *Sessilia pusilla* ou par contacts mécaniques entre les plantes. Les premiers symptômes de la maladie se traduisent par l'apparition de panachure jaune sur les feuilles du riz, due à la perte de chlorophylle. Lorsque l'infection continue, la marbrure jaune devient orange et les feuilles infectées meurent ultérieurement. L'infection entraîne un retard de croissance de la plante et affecte la formation des panicules. La base génétique de la résistance élevée chez le riz a été étudiée (Ndjiondjop *et al.*, 1999). Plusieurs QTL et gènes de résistance ont été identifiés (Albar *et al.*, 2006 ; Boisnard *et al.*, 2007 ; Thiémélé *et al.*, 2010) et déployés dans la riziculture par sélection assistée par marqueurs.

I.8.2.3 La bactériose vasculaire du riz (Bacterial

Leaf Blight BB)

La bactériose vasculaire du riz est causée par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Elle a été observée pour la première fois en 1884 au Japon.

I.8.2.3.1- Symptomatologie

La maladie se traduit par de courtes lésions jaunâtres qui apparaissent en marge de la feuille et se développent sur toute la surface de celle-ci. Ces lésions partent du point d'entrée de la bactérie que sont les hydathodes, les stomates et les blessures. Sur de jeunes plantes, ces lésions, d'abord vert pâle à gris-vert, se colorent en blanc jaunâtre, et fusionnent pour atteindre la totalité de la feuille. Au stade de tallage maximum, la feuille entière est affectée par ces grandes lésions jaunâtres pouvant devenir nécrotiques,

entraînant la perte de la feuille (Figure I-5). Il existe une forme plus sévère et systémique de la maladie, appelée "kresek" ou flétrissement. Elle se caractérise par le développement de lésions grisâtres suivi d'un flétrissement complet et brusque de la jeune plantule après transplantation. En effet, une fois que *Xoo* pénètre dans la feuille, elle se propage de manière systémique. Après plusieurs cycles de multiplication, les nombreuses bactéries envahissent non seulement le système vasculaire mais aussi le mésophylle environnant. Ce flétrissement peut également affecter les plantes plus âgées (Mew *et al.*, 1993).



Figure I-7 : *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* en microscopie électronique.

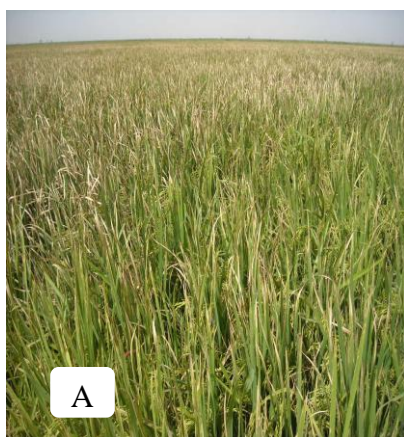


Figure I-5 : Symptômes de la bactériose vasculaire du riz A : Parcelle atteinte B : Flétrissement des feuilles

I.8.2.3.2- Répartition géographique (Figure I-6)

La bactériose vasculaire du riz a été observée pour la première fois par des agriculteurs, en 1884, dans la province de Kyushu au sud du Japon (Mew, 1988). Dans les années soixante, la maladie s'est répandue dans toute l'île, infectant plusieurs centaines de milliers d'hectares de culture. Elle a été aussi signalée dans de nombreux pays voisins comme la Chine, l'Indonésie, la Taïwan et la Thaïlande. Elle s'est rapidement propagée dans les pays tropicaux de l'Asie comme l'Inde, le Sri-Lanka, les Philippines, le Bangladesh et la Malaisie. Elle a été détectée ensuite en Australie (Aldrick *et al.*, 1973), en Amérique latine et centrale (Lozano, 1977) notamment au Venezuela, au Mexique, au Costa Rica, en Honduras, au Salvador, Colombie et en Bolivie. Sa présence a été également noté en Afrique de l'ouest et du centre (Buddenhagen *et al.*, 1979; Awoderv *et al.*, 1991, Séré *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2007). En plus, les symptômes de la maladie ont été observés en Amérique du nord en Louisiane et au Texas (Jones *et al.*, 1989). A ce jour, la bactériose vasculaire du riz est présente dans tous les pays rizicoles tropicaux. Seule l'Europe semble en être épargnée.



Figure I-6 : Répartition géographique de la bactériose vasculaire du riz. D'après le rapport OEPP, Mew T W, 1988 et Verdier V (com. pers.). Les points rouges représentent les pays où la détection de *Xoo* a été effectuée et confirmée.

I.8.2.3.3- Impacts économiques

A la fin des années 1960, environ 500000 hectares soit 10% de la culture du riz étaient déjà infectés par la bactériose vasculaire du riz (Mizukami et Wakimoto, 1969) qui pouvait occasionner une perte de rendement allant jusqu'à 50% de la récolte. L'intensification des cultures a eu pour effet d'accroître la sévérité de la maladie. Généralement, les plantes sont affectées pendant le tallage, induisant une perte de rendement de 10 à 50% (Mew, 1993). Mieux documentées, et de manières plus récentes, des études de modélisation réalisées dans les régions du sud et sud-est Asiatique indiquent que l'impact de la bactériose vasculaire y est devenu faible contrairement en Afrique. En effet, la mise en place de lignées sélectionnées de plantes hôte-résistantes, a permis aujourd'hui de réduire considérablement les pertes de rendement dans ces régions (Savary *et al.*, 2000a; Savary *et al.*, 2000b; Willocquet *et al.*, 2004; Zeigler et Savary, 2010). Les récentes prospections effectuées en Afrique de l'Ouest en 2003, 2009 et 2011 ont montré une augmentation de l'incidence de la maladie. Les pertes de rendement occasionnées varient entre 20 et 80% (Onansaya *et al.*, 2009).

I.8.2.3.4- L'agent pathogène

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo) est une gamma protéobactérie phytopathogène gram négative. Il appartient à l'ordre des *Xanthomonadales* et de la famille des *Xanthomonadaceae*. Le genre *Xanthomonas* comporte de nombreuses espèces capables d'infecter plus de 124 espèces monocotylédones et 268 espèces dicotylédones. Les *Xanthomonas* sont des bactéries flagellées en forme de bâtonnet (Figure I-7). Xoo fut successivement classée comme étant *Bacillus oryzae*, puis *Pseudomonas oryzae* avant d'être rebaptisée *Xanthomonas oryzae* (Swings et al. 1990). Xoo est une bactérie aérobie dont les températures optimales de croissance varient de 25 à 30 °C. Son génome d'une taille de 4,9 à 5,2 Mb a été séquencé pour plusieurs souches asiatiques (Lee *et al.*, 2005). Plusieurs souches africaines sont en cours de séquençage par l'équipe de Valérie Verdier à l'IRD Montpellier (Verdier *et al.*, 2011). Une étude moléculaire a montré que les souches Asiatiques et Africaines de Xoo sont génétiquement distinctes (Gonzalez *et al.*, 2007). En effet, l'analyse comparée de ces deux génomes de Xoo par la technique SSH « Suppression-Subtractive Hybridization » (Soto-Suarez *et al.*, 2010) a révélé des séquences non redondantes qui sont spécifiques aux souches Africaines de Xoo. Les souches Africaines et Asiatiques de Xoo diffèrent également par leur nombre de TALs. En effet, une étude comparée a montré la présence de 19 gènes codant pour des effecteurs TALs chez la souche Asiatique PXO99^A (Salzberg *et al.*, 2008) alors que les souches Africaines n'en comptent que 8 (Gonzalez *et al.*, 2007). L'étude de

pathogénicité a mis en évidence trois races africaines A1, A2 et A3 de *Xoo* (Tableau I-1)

Tableau I-1 : Différentes races de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* d'origine africaine identifiées en fonction de leur réaction après inoculation sur des lignées isogéniques IRBB de riz

Races		A1	A2	A3
Hôte		Oryza sativa	Oryza glaberrima	Oryza sativa
Origine		Burkina ; Cameroun ; Niger	Burkina	Mali
Souches		NAI1 à NAI9 ; BAI1, BAI2, BAI3, CFBP1947, CFBP1948	BAI4	MAI1, MAI2, MAI9, CFBP1949, CFBP1951, CFBP1952
NILs	Gène			
IR24		S	S	R
IRBB3	Xa3	S	R	R
IRBB4	Xa4	R	R	R
IRBB5	xa5	R	R	R
IRBB7	Xa7	R	R	R
IRBB8	xa8	MS	R	R
IRBB10	Xa10	S	MR	R
IRBB11	Xa11	S	R	R
IRBB13	xa13	S	MR	R
IRBB14	Xa14	S	MR	R
IRBB21	Xa21	MS	MR	R

Résistant (R) : longueur de lésion < 5 cm ; Modérément résistant (MR) : longueur de lésion comprise entre 5 et 10 cm ; Modérément sensible (MS) : longueur de lésion de 10 à 15 cm et Sensible (S) : longueur de lésion > 15 cm.

I.8.2.3.5- Cycle infectieux

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*, l'agent pathogène de la bactériose vasculaire du riz, pénètre dans la plante hôte par les pores naturels que sont les hydathodes mais aussi par les blessures et les ouvertures créées par les racines émergentes à la base de la gaine des feuilles. Une fois entrées par les hydathodes, les bactéries se multiplient dans les espaces intercellulaires de l'épiderme avant d'envahir toute la plante via les vaisseaux du xylème. La bactérie progresse alors de manière verticale dans le xylème, mais aussi de manière latérale au sein des vaisseaux secondaires. Au bout de quelques jours, la bactérie et sa production d'exopolysaccharides (EPS) remplissent les vaisseaux et finissent par suinter hors de la plante en formant des exsudats à la surface de la feuille.

Ces exsudats peuvent alors être la source d'un inoculum secondaire (Mew *et al.*, 1993) pouvant tomber dans les eaux d'irrigation. Ces eaux contaminées envahissent toute la rizière et peuvent même atteindre d'autres champs durant la saison des pluies et constituent ainsi une grande source de dissémination. Les exsudats sont ainsi généralement dispersés par l'irrigation mais aussi par le vent, les pluies, ou encore les insectes. En effet, Mohiuddin *et al.* (1976) ont montré que l'insecte *Leptocorisa acuta* transmet mécaniquement la maladie. De même, Murty *et Devadath* (1981) ont démontré que la cicadelle *Nephotettix virescence* peut transmettre l'agent pathogène. Aussi, il est à noter que le matériel végétal infecté, les repousses de riz (Durgapal, 1985), la paille ou des débris infectés (Devadath *et Dath*, 1985) et les adventices hôtes sont de potentielles sources d'inoculum, bien que le rôle de ces sources dans la nature soit mal connu. Dans les pays tempérés où la bactérie ne peut survivre pendant l'hiver, les mauvaises herbes de type *Leersia hexandra* poussant le long des canaux d'irrigation ainsi que dans les fossés, constituent probablement la principale source d'inoculum de *Xoo*. La bactérie survit dans la rhizosphère de cet hôte alternatif, puis se multiplie avec l'apparition de nouvelles tiges printanières de riz. L'irrigation des pépinières ou des rizières permettra alors de nouvelles infections. La paille et les déchets au sol constituent la seule alternative de la bactérie pour une survie hivernale si aucune plante de *Leersia* n'est à proximité. Les semences constitueraient une probable voie de contamination ; ce qui n'a pas été confirmé (Murty V *and Devadath S*, 1984). Ces derniers ont montré que les semences infectées ne donnent pas des plantes infectées mais transmettent tout de même les bactéries dans le sol. Cependant, Singh D *et al.* (1973) ont mis en évidence une transmission par graines en chambre climatisée en utilisant des échantillons très contaminés

I.8.2.3.6- Les méthodes de lutte

Les pratiques culturales, la lutte chimique et biologique, et la création de variétés de riz résistantes par sélection de gènes majeurs de résistance sont les trois moyens de lutte contre la bactériose vasculaire. Les différentes pratiques culturales sont, entre autre, le traitement des semences avant semis, la fertilisation adéquate en fonction du stade de développement des plantes et l'espacement des plantes saines au champ. Associé à ces précautions, le désherbage est pratiqué afin d'éviter la contamination des eaux d'irrigation. Comme méthodes de lutte chimique, nous avons l'utilisation d'antibiotiques, ou simplement d'eau chaude dans les pépinières pour désinfecter les graines et la désinfection des eaux d'irrigation avant et après transplantation des jeunes plantes. Ces méthodes chimiques, parfois inefficaces avec des conséquences néfastes sur l'environnement, ne sont pas adoptées dans tous les pays. Très récemment l'utilisation d'extraits de plante a été testée avec succès

(Govindappa *et al.*, 2011). L'autre alternative est l'utilisation d'agents biologiques de lutte contre *Xoo* adoptée par les Indiens. Ainsi, certaines bactéries épiphytes ou de la rhizosphère du riz, comme des *Pseudomonas*, possèdent des activités antibiotiques contre *Xoo*. Bien que les molécules actives n'aient pas encore été identifiées, certaines bactéries ont pu être utilisées pour des traitements préventifs des graines. L'utilisation de variétés résistantes est l'approche la plus utilisée et la plus efficace eu égard à la trentaine de gènes majeurs de résistance à *Xoo* identifiés. Certains de ces gènes ont été introgressés dans des variétés élites de riz sensibles et confèrent à ces variétés une résistance à la bactérie. Néanmoins, la durabilité de ces gènes de résistance est faible (Vera Cruz *et al.*, 2000) du fait de l'évolution de la bactérie qui permet de contourner rapidement les défenses de la plante induites par un gène majeur de résistance (Jeung *et al.*, 2006; Kottapalli *et al.*, 2010). Le pyramidage qui consiste à introgresser plusieurs gènes de résistance dans la plante hôte, semble conférer une résistance plus durable. En effet, la pression adaptative nécessaire pour contourner ces résistances est telle que la bactérie n'est pas en mesure d'évoluer dans ce sens sans conséquence sur sa « fitness » (Bai *et al.*, 2000; Jeung *et al.*, 2006; Kottapalli *et al.*, 2010).

I.8.2.4- La bactériose à strie foliaire (Bacterial Leaf Streak BLS)

Bien que moins importante que la bactériose vasculaire, la bactériose à strie foliaire causée par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) peut engendrer des pertes de rendement allant jusqu'à 30% dans le cas d'une infection sévère selon la variété de riz et les conditions climatiques. Cette maladie prend de l'ampleur dans certains pays asiatiques comme la Chine où les variétés hybrides particulièrement sensibles au BLS (Xie *et al.*, 1998) sont cultivées. Elle est aussi signalée en Afrique de l'ouest au Burkina et au Mali (Gonzalez *et al.*, 2007 ; Wonni *et al.*, 2011). Le genome de la souche *Xoc* BLS256 (Philippines) a été récemment séquencé (Bogdanove *et al.*, 2011). Contrairement à *Xoo* qui est vasculaire, *Xoc* pénètre dans les feuilles par les stomates mais n'envahit pas les vaisseaux de xylème. La bactérie se multiplie dans les cavités substomatales et progresse dans les espaces intercellulaires du parenchyme. La maladie se déclenche par l'apparition, en bordure des feuilles, de lésions en bandes étroites, humides et noires verdâtres entre les nervures. Ces lésions évoluent, fusionnent parfois, puis deviennent jaunes, oranges ou brunes suivant la variété de riz. Au stade avancé de la maladie, on observe sur les lésions, des exsudats bactériens. Les feuilles infectées peuvent devenir grisâtres à blanches et meurent. A ce stade, il est très difficile de distinguer le BLS du BLB.

I.8.2.5- Les nématodes

Plusieurs nématodes ont été identifiés sur le riz en Afrique. Ces nématodes entraînent un dessèchement apical des feuilles et des lésions nécrotiques sur les grains de riz (*Aphelenchoides besseyi*), soit une distorsion à la base des feuilles (*Ditylenchus Angustus*), soit encore des nodosités sur les racines des plants (*Meloidogyne spp.*). Il a été noté jusqu'à 30% de pertes de rendement.

I.8.2.6- Le flétrissement de la gaine

C'est une maladie d'importance mondiale qui est causée par le champignon *Rhizoctonia solani*. Elle peut engendrer des pertes allant de 24 à 50% de l'économie mondiale du riz (Lee et Rush, 1993). Il est très dévastateur surtout dans les systèmes de production intensive particulièrement au cours de l'initiation paniculaire ou de la floraison (Cu *et al.*, 1996). Il se manifeste par la présence de taches gris verdâtre de 1 à 3 centimètres de long sur la gaine. Le centre des taches blanc grisâtre avec un pourtour marron ou violacé selon la variété et les facteurs environnementaux. Des sclérotés se forment autour de ces taches et la contamination peut atteindre toute la tige détruisant complètement les feuilles.

I.8.2.7 Autres contraintes biotiques

Plusieurs autres contraintes biotiques occasionnent des dégâts importants surtout en Afrique, avec une perte de récolte élevée. Au nombre de ces contraintes, nous pouvons citer les oiseaux, les insectes ravageurs dont les foreurs de tiges, les défoliateurs et les succeurs ; les rongeurs qui attaquent le riz dans les périmètres rizicoles et les endroits de stockage; les adventices qui compétissent avec le riz pour l'espace, l'eau, les nutriments et la lumière.

II- Relation plante-pathogène

Dans la nature, les plantes sont attaquées par différents agents pathogènes au nombre desquels les bactéries, les champignons, les virus et les nématodes. En réponse à ces attaques, les plantes réagissent en développant des mécanismes de défense qui peuvent leur conférer la résistance. En revanche, ces mécanismes peuvent être surmontés par

l'agent pathogène conduisant à la sensibilité des plantes. Il s'établit alors des interactions entre l'agent pathogène et la plante. Le riz, est une plante modèle permettant une meilleure compréhension de ces interactions qui sont de deux types à savoir l'interaction compatible et l'interaction incompatible. Dans le premier cas, l'agent pathogène pénètre la plante, s'y développe et induit la maladie. Par contre, dans le cas d'une interaction incompatible, l'agent pathogène, bien que virulent, est incapable d'induire la maladie ; la plante résiste. Il existe deux types de résistance que sont la résistance monogénique ou verticale (qualitative) contrôlée par un seul gène généralement dominant et la résistance polygénique ou horizontale (quantitative) contrôlée par plusieurs gènes ayant des effets additifs. Cette dernière présente une variation continue au sein des individus d'une population et peut être spécifique de certaines races d'agents pathogènes. Au cours de l'infection, les plantes développent des mécanismes de réponse sophistiqués contre les agents pathogènes. Ces mécanismes consistent en une combinaison de réponses constitutive et/ou induites qui peuvent se localiser au site d'infection (réponse locale) ou être induites dans la plante entière (réponse systémique).

II-1 Résistance constitutive (passive)

En général, les plantes possèdent deux mécanismes passifs de résistance aux agents pathogènes. Le premier est d'ordre structural. En effet, les plantes mettent en place une barrière en produisant de la cutine, de la subérine et de la cire afin d'empêcher la dessiccation, la germination des spores fongiques, et la pénétration des bactéries et autres agents pathogènes (Mysore et Ryu, 2004). Le deuxième mécanisme est biochimique. Les plantes produisent de nombreux métabolites secondaires dont certains jouent un rôle de protection contre les agents pathogènes et les herbivores (Bednarek et Osbourn, 2009). Pour empêcher la pénétration des agents pathogènes par les blessures, les plantes isolent les zones blessées par la formation de nouvelles parois épaisses, et la production locale de composés phénoliques toxiques (anthocyanes, flavonoides, précurseurs phénoliques de lignines). De plus, les plantes produisent de manière constitutive de nombreux métabolites secondaires capables d'agir comme des substances antimicrobiennes (tannins, phénols, coumarines, quinones, terpénoïdes, thionines, saponines) (Cowan, 1999; Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2009).

II-2 Résistance induite (active)

La reconnaissance de l'agent pathogène par la plante est indispensable pour l'induction des mécanismes de défense qui sont de plusieurs types à savoir :

II-2-1 Réponse d'hypersensibilité (Hypersensitive responses HR)

La réponse d'hypersensibilité est caractérisée par la mort des cellules végétales au site d'infection quelques heures après l'infection (Klement et Goodman, 1967). Cette mort cellulaire programmée est une résistance locale efficace. Au cours de la réaction d'hypersensibilité, les plantes induisent un « burst » oxydatif avec production de formes réactives d'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique (NO) (Delledonne *et al.*, 2001). Les ROS les plus importants sont les super oxydes (O_2^-) avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sont produits en quantité toxique aussi bien pour les cellules végétales que pour l'agent pathogène (Nanda *et al.*, 2010). Ils jouent un rôle important dans l'expression des gènes de défense et dans le renforcement des parois cellulaires. Ils agissent aussi comme des messagers tels que l'acide salicylique, déclenchant la modification de flux d'ions notamment un efflux de K^+ , Cl^- et un influx de Ca^{2+} , H^+ (Pontier *et al.*, 1998). Des polyamines libres (Walters, 2003) et des composés phénoliques (phénylpropanoïdes, phytoalexines) sont également produits. De plus, HR induit la production de protéines telles que les defensines qui sont des protéinases impliquées dans la dégradation des parois bactériennes (Boman, 2003 ; Thomma *et al.*, 2002; Carvalho et Gomes, 2009; Martin *et al.*, 2003). HR est donc un mécanisme de résistance très efficace qui, non seulement, bloque l'agent pathogène au site d'infection, mais aussi produit différents signaux conduisant à la résistance locale et systémique contre une nouvelle agression microbienne.

II-2-2 Resistance locale acquise (Locally-acquired resistance ou LAR)

Les cellules végétales qui détectent l'agent pathogène au site HR émettent des signaux vers celles qui sont proches de la zone nécrotique, induisant une résistance locale acquise LAR (Dorey *et al.*, 1997). Cette résistance est très forte et conduit à l'accumulation de molécules antimicrobiennes telles que des saponines, des flavonoïdes, des anthocyanines, des coumarines, des phytoalexines (Cordelier *et al.*, 2003). Les cellules proches de la zone nécrotique installent elles aussi des barrières physiques et chimiques telles que la callose, la lignine et autres composés phénoliques (Klarzynski et Fritig, 2001) en vue de bloquer la progression de l'agent pathogène. La LAR est considérée comme une étape intermédiaire entre la réaction d'hypersensibilité et la résistance systémique acquise (Dorey *et al.*, 1997).

II-2-3 Résistance systémique acquise (Systemic-acquired resistance or SAR)

La résistance systémique acquise consiste en une activation de gènes qui conduit à l'induction et au maintien de la résistance de la plante entière à un large spectre d'agents pathogènes (Durrant et Dong, 2004). Ce phénomène appelé immunité physiologique acquise ou résistance induite (Ross, 1961) a été décrit chez plusieurs plantes. L'induction de la SAR nécessite l'acide salicylique. En effet, pour conduire les signaux de défense du site d'infection, la plante utilise un messenger qui est un dérivé de l'acide salicylique appelé le méthyle salicylate (Durrant et Dong, 2004); (Park *et al.*, 2007; Vlot *et al.*, 2008). Cette résistance est corrélée avec l'expression de protéines de défense ou protéines PR (Pathogenesis Related). Ces protéines sont très stables en milieu acide et résistent aux protéases produites aussi bien par la plante que par l'agent pathogène. Ces propriétés confèrent aux plantes une stabilité dans les environnements défavorables (Kauffmann *et al.*, 1999). En dehors du blocage de l'agent pathogène au site d'infection lors de la réaction d'hypersensibilité, la HR semble donc préparer les réactions de défense de la plante par l'induction de la résistance locale acquise et de la résistance systémique acquise. La HR prépare donc les cellules non infectées à surmonter de nouvelles attaques microbiennes.

II-2-4 La reconnaissance de l'agent pathogène par les plantes.

La résistance à la maladie dépend de la capacité de la plante à reconnaître très tôt l'agent pathogène au cours de l'infection. La plante reconnaît l'agent pathogène grâce aux éliciteurs produits par ce dernier (Dixon *et al.*, 1996). Un éliciteur est une molécule produite par l'agent pathogène qui, détectée par la plante, induit les mécanismes de défense de la plante avec production de substances défensives (Ebel et Mithöfer, 1998). Il existe deux types d'éliciteurs à savoir les éliciteurs généraux et les éliciteurs race-spécifiques.

II-2-4-1 Perception des éliciteurs généraux des bactéries.

Les éliciteurs généraux stimulent des réponses de défense chez toutes les plantes. La reconnaissance des éliciteurs par les plantes semble similaire à l'immunité innée chez les animaux (Kimbrell et Beutler, 2001). En effet, la cellule végétale reconnaît des molécules spécifiques associées à l'agent pathogène. Ces molécules sont appelées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) (He *et al.*, 2007 ; Boller et Felix, 2009 ; Postel et Kemmerling, 2009). La

perception des PAMPs est faite par les récepteurs PRRs (Pathogen Recognition Receptors) de la plante. Ces PAMPs sont des molécules fortement conservées chez les pathogènes et sont indispensables à leur survie (Medzhitov et Janeway, 2000 ; 2002). Chez les bactéries, les PAMPs peuvent être des oligosaccharides (glycoprotéines ou polysaccharides), des protéines ou des peptides. Les lipopolysaccharides (LPS) sont des constituants majeurs de la membrane externe des cellules. Ils peuvent être perçus par les plantes comme des signaux de la présence de l'agent pathogène et éliciter des réactions de défense telles que HR ou "burst" oxydatif chez la plante hôte (Dow *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 2002 ; Erbs *et al.*, 2008). Comme protéines éliciteurs, nous pouvons citer les harpines sécrétées par les systèmes de sécrétion de type III qui induisent des réponses de défense dans les plantes (Alfano et Collmer, 1997; Charkowski *et al.*, 1998 ; Dong *et al.*, 1999). De même, la flagelline des bactéries constitue un éliciteur puissant chez le tabac, la tomate et l'*Arabidopsis* (Komoriya *et al.*, 1999). Un autre récepteur de protéine kinase riche en leucine, le XA21 du riz, est capable de reconnaître les composants du système de sécrétion de type I de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et peut donc induire des réponses chez la plante (da Silva *et al.*, 2004). Les protéines RaxP et RaxQ de *Xoo* peuvent être reconnues par Xa21 et sont donc nécessaires pour l'activité de la protéine d'aviorulence AvrXa21 (Shen *et al.*, 2002). Plusieurs bactéries pathogènes sont capables de surmonter les réponses de défense de la plante en injectant des protéines effectrices dans les cellules végétales qui empêchent la mise en place des réactions de défense basale.

II-2-4-2 Perception des éliciteurs spécifiques des bactéries.

La perception des pathogènes peut être spécifique. Les éliciteurs race-spécifiques sont des molécules codées par les gènes d'aviorulence (*Avr*) de l'agent pathogène (de Wit *et al.*, 1997). Ceci implique une interaction directe ou indirecte entre le produit du gène de résistance (*R*) de la plante et celui du gène d'aviorulence (*avr*) de l'agent pathogène (de Wit *et al.*, 1997). Ce type d'interaction est appelée "gène pour gène" dans laquelle, à chaque gène de résistance de la plante, correspond un gène d'aviorulence de l'agent pathogène. Décrit par Flor *et al.* (1971), les auteurs ont postulé qu'en présence des deux gènes de résistance et d'aviorulence, l'agent pathogène est incapable d'effectuer son cycle d'infection. Dans ce cas, l'interaction est dite incompatible. Par contre, en l'absence de l'un des deux gènes, l'agent pathogène est capable d'achever le cycle infectieux et déclencher la maladie. L'interaction, dans ce cas est dite compatible. A ce jour, une quarantaine de gènes d'aviorulence ont été identifiés chez les bactéries pathogènes des genres *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* et *Ralstonia*. Bien que les gènes d'aviorulence permettent la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante, conduisant à une interaction incompatible, certains d'entre eux sont impliqués dans le

pouvoir pathogène de la bactérie et interviennent à une étape spécifique du métabolisme cellulaire de la plante hôte et supprime sa réponse de défense.

II-3 Principes généraux des interactions moléculaires: le model zigzag

La première interaction moléculaire mise en place dans les dix minutes qui suivent la pénétration de l'agent pathogène dans la plante est celle entre le PAMPs et le PRR. La réaction de la plante dépend de celle déclenchée par les PAMPs (PAMP-Triggered Immunity: PTI). Les pathogènes, en particulier les bactéries, évoluent et contournent ou suppriment la réaction d'immunité innée de la plante en injectant des effecteurs dans la cellule hôte. Ces effecteurs sont donc capables de rendre sensible la plante (Effector-Triggered Susceptibility: ETS). La plante peut spécifiquement détecter les effecteurs grâce à un récepteur intracellulaire NB-LRR codé par un gène de résistance. La résistance qui en résulte (Effector Triggered Immunity follows: ETI) est donc plus rapide et plus forte que celle causée par la reconnaissance des PAMPs et qui conduit à la réaction d'hypersensibilité HR au site d'infection. Pendant l'évolution, certains micro-organismes évoluent et acquièrent de nouveaux effecteurs. Les effecteurs déjà reconnus d'autres micro-organismes sont sélectionnés et seront capables de surmonter les réactions de défense des plantes. Ce cycle de résistance et de contournement de résistance est appelé le model zigzag (Abramovitch *et al.*, 2006 ; Chisholm *et al.*, 2006 ; Jones et Dangl, 2006) (figure I-8).

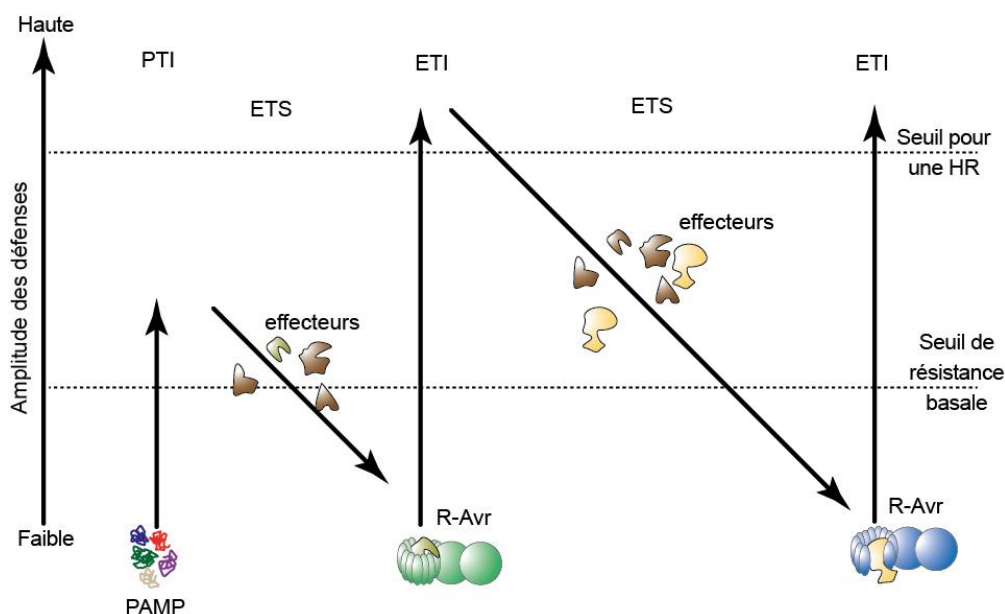


Figure I-8 : Le modèle en Zig-Zag illustrant l'interaction plante-pathogène (Jones et Dangl, 2006)

II-4 Les systèmes de sécrétion et les protéines effectrices

La plupart des gènes de virulence/avirulence codent pour des protéines effectrices de type III. Il existe deux grandes familles d'effecteurs chez *Xanthomonas*. La première est *avrBs3/pthA* (Bonas *et al.*, 1993). Elle est spécifique et largement représentée. *AvrBs3* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Bonas *et al.*, 1989) et *PthA* de *X. axonopodis* pv. *citri* (Swarup *et al.* 1992) sont le prototype de cette importante famille de protéines effectrices de type III. Les protéines effectrices de type III sont injectées dans les cellules végétales par les systèmes de sécrétion de type III (T3SS). Les T3SS assurent donc la translocation des protéines de virulence dans le cytoplasme des cellules hôtes (Bogdanove *et al.*, 1996). Les T3SS sont conservés chez les bactéries pathogènes. Les protéines structurales et régulatrices des systèmes de sécrétion de type III sont codées par des gènes *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) chez les bactéries phytopathogènes (Bogdanove *et al.*, 1996). Chez *Xanthomonas*, l'expression des gènes *hrp* est contrôlée par deux gènes: *hrpX* et *hrpG* (Furutani *et al.*, 2004). Les gènes *hrp* sont indispensables à la bactérie pour son interaction avec les cellules de la plante. En effet, un mutant *hrp* est incapable i) de croître dans la plante, ii) d'induire la maladie chez une plante sensible et iii) d'induire la réponse de défense chez une plante résistante. En plus du système de sécrétion de type III et du rôle de ses protéines effectrices, d'autres éléments sont indispensables à la capacité pathogénique. C'est le cas de divers systèmes de sécrétion (standard I, type II, type IV) et de leurs substrats tels que des protéines possédant des fonctions de défense contre les enzymes impliquées dans la détoxification des formes oxydatives d'oxygène produites au cours des réactions de défense de la plante, et de nombreuses structures adhésives comme les lipopolysaccharides, les exopolysaccharides, des pili de type-I et type-IV (Thieme *et al.*, 2005). Parmi les systèmes de sécrétion, le plus simple est celui de type I. Il permet d'injecter les effecteurs directement du cytosol dans l'espace extracellulaire. Les effecteurs sécrétés par cette voie sont des protéases et des lipases de *Erwinia chrysanthemi* (Zhang *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2001). La structure du système de sécrétion de type II est plus complexe et la sécrétion d'un effecteur par ce système se fait en deux étapes : i) transport vers le périplasme (espace entre la membrane interne et la membrane externe de la bactérie) et ii) sécrétion à travers la membrane externe. Les effecteurs impliqués dans la dégradation des parois cellulaires tels que les pectatolyases, les polygalacturonases, et les cellulases produits par des espèces appartenant aux genres *Erwinia* et *Xanthomonas* sont sécrétés par ce système de sécrétion (Barras *et al.*, 1994; Salmond, 1996). Le système de sécrétion de type IV a été bien décrit chez *Agrobacterium tumefaciens*. Seul ce système permet la translocation des protéines et des acides nucléiques.

III- De la cartographie de locus à caractère quantitatif (QTL) à l'identification et validation de gènes

L'amélioration génétique des plantes nécessite l'identification et la cartographie de gènes d'intérêt. Le développement des marqueurs moléculaires permet d'analyser aussi bien les caractères à hérédité simple contrôlés par un gène majeur que les caractères quantitatifs complexes gouvernés par un QTL (Quantitative trait locus). Les marqueurs moléculaires peuvent donc permettre de cibler des QTLs et d'évaluer leur contribution à l'expression d'un phénotype par la sélection d'allèles favorables à ces loci. Un QTL ou locus à caractère quantitatif est un locus polymorphe constitué de plusieurs allèles qui affectent préférentiellement l'expression d'un caractère phénotypique à distribution continue. De nombreux caractères agronomiques importants sont gouvernés par des QTLs. L'étude de ces derniers est d'une importance capitale car des allèles intéressants du point de vue agronomique peuvent être introgressés par sélection assistée par marqueurs (SAM) chez les cultivars élites. Chez le riz, l'identification des facteurs impliqués dans des QTL gouvernant la date de floraison (Hd1, Hd3a, Hd6 et Edh1), le nombre de grains (Gn1a), la taille du grain (GS3), la tolérance au sel (SKCI), la capacité de régénération (PSR1), le détachement grain (Sh4 et qSH1), la tolérance à la submersion (Sub1aA) et la résistance à de nombreuses maladies a été rapportée (Adhikari et Matsu, 2006 ; Perata et Voesenek, 2007).

L'identification et la cartographie de locus à caractère quantitatif QTL nécessite la construction d'une carte génétique qui passe par le développement de population de cartographie et son génotypage, et des analyses statistiques à l'aide de logiciels appropriés. Le type de population et sa taille, de même que le type et le nombre de marqueurs moléculaires utilisés sont des facteurs déterminants dans la précision de la carte génétique. Une grande population et un nombre élevé de marqueurs moléculaires permettent de construire une carte génétique assez précise. Le phénotypage est aussi une étape cruciale de la cartographie de QTL et exige une très grande précision dans la prise des valeurs des caractères ciblés. Plusieurs méthodes d'analyses aussi variés que complexes permettent d'identifier des QTL en utilisant des logiciels adaptés. Ces analyses passent des plus simples telles qu'ANOVA et « single interval mapping » aux plus complexes que sont « le composite interval mapping », le « multiple interval mapping » et les méthodes bayésiennes.

III-1 Détection et cartographie de QTL

La détection de QTL repose sur la recherche d'associations entre un caractère quantitatif et des allèles de marqueurs qui ségrégent dans une population. Elle nécessite trois choses essentielles : d'abord une population de cartographie et une carte génétique bien saturée en marqueurs moléculaires, construite à partir de la population de cartographie, ensuite une méthode de phénotypage très fiable et enfin une variation génétique du caractère d'intérêt au sein de la population de cartographie. Elle se déroule en trois étapes à savoir une évaluation phénotypique fine, un génotypage robuste de la population de cartographie en vue de construire une carte génétique, et une analyse des données à l'aide de logiciels statistiques adéquats.

III-1-1 Population de cartographie et phénotypage

Le développement d'une population classique de cartographique nécessite deux parents génétiquement distincts pour le (les) caractère (s) à cartographier. Cela permet de créer du polymorphisme. Mais en même temps, les parents de croisement ne doivent pas être génétiquement très éloignés l'un de l'autre afin d'éviter la stérilité reproductive des descendants et un niveau élevé de distorsion de ségrégation lors des analyses de liaison (Semagn *et al.*, 2006b). Chez les plantes autogames, les populations F_2 , de rétrocroisements BC (backcross), d'haploïdes doublés (DH), de lignées recombinantes (RIL) et de lignées isogéniques (NIL) sont les plus utilisées (Burr *et al.*, 1988; He *et al.*, 2001; Doerge *et al.*, 2002). La F_2 est obtenue par autofécondation des hybrides F_1 obtenus à l'issue du croisement des parents. La population de backcross se développe par rétrocroisement des hybrides F_1 avec le parent récurrent. Quant aux lignées recombinantes, elles sont obtenues par autofécondations successives à partir de la F_2 jusqu'en F_8 . Le développement des lignées isogéniques se fait par au moins six backcross successifs. A cette étape de BC6, les descendants contiennent au moins 99% du génome du parent récurrent (Babu *et al.*, 2004). A la génération BC_7F_1 , certains individus sont sélectionnés et autofécondés pour produire des BC_7F_2 , homozygotes pour le gène cible. Ces lignées porteuses du gène cible et qui ne diffèrent du parent récurrent que par ce gène sont appelées des lignées isogéniques (NIL) du parent récurrent. Les haploïdes doublés sont produits par dédoublement des gamètes des hybrides F_1 ou d'individus de la population F_2 . Par la technique de culture de tissus, les plantes sont régénérées après induction du dédoublement chromosomique dans les grains de pollen. Les différents schémas de développement de ces populations sont résumés sur la figure I-9.

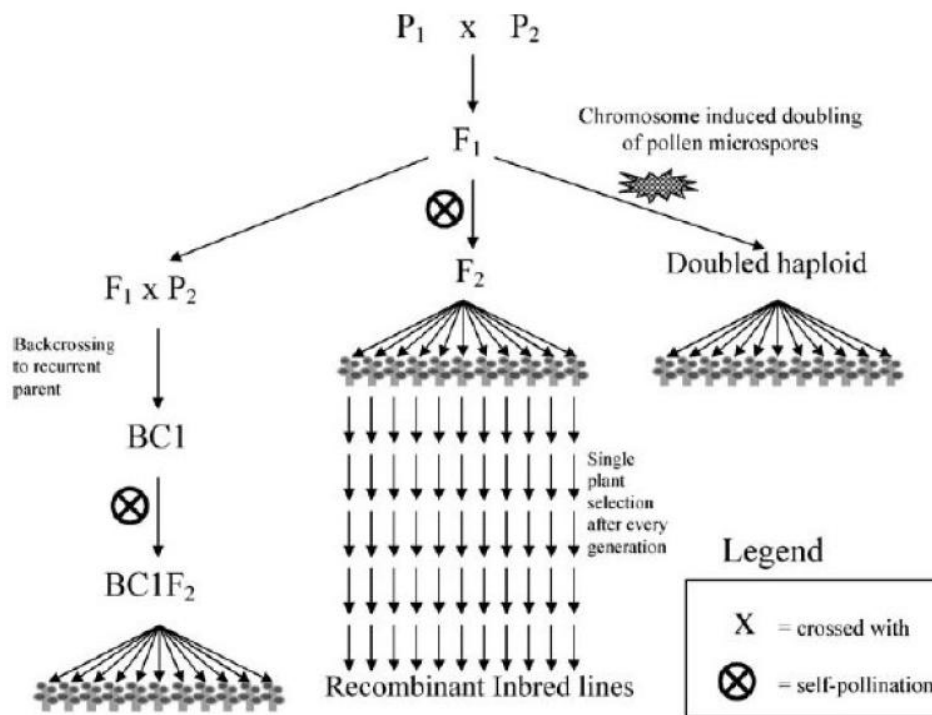


Figure I-9 : Diagramme des principaux types de populations de cartographie des espèces autogames (Collard *et al.*, 2005)

Les études antérieures ont montré que les cartes génétiques ont été construites en utilisant différents types de populations, le type de population pouvant influencer la cartographie (Ferreira *et al.*, 2006). En effet, la comparaison entre la carte génétique d'une population d'haploïdes doublés et celle de lignées recombinantes toutes deux issues du même croisement chez le riz, a montré des différences significatives (He *et al.*, 2001). La longueur de la carte génétique par chromosome dans la population de lignées recombinantes est inférieure à celle obtenue dans la population d'haploïdes doublés. La longueur totale de la carte pour la population de lignées recombinantes ne représente que 70.5% de celle de la population des haploïdes doublés bien que l'inverse aurait été observé à cause du nombre élevé d'événements de recombinaison attendu dans la population de lignées recombinantes. Chaque population de cartographie présente ses avantages mais aussi des inconvénients (McCouch and Doerge, 1995; Paterson *et al.*, 1996). Le choix du type de population est donc crucial et dépend des objectifs du projet de recherche, de sa durée et donc du temps disponible pour développer la population de cartographie, du type de marqueurs (dominant ou co-dominant) qui sera utilisé pour le génotypage de la population, de l'espèce de plante et du caractère à cartographier. Les populations F_2 et de backcross sont les plus simples et les plus faciles à développer et ce, pendant un temps très court. Cependant, elles présentent des limites.

D'abord, le phénotype d'un individu ne peut pas être reproduit. Il sera donc impossible de mettre en place des essais avec des répétitions biologiques. Ensuite, les interactions telles que les épistasies dans ces populations ne sont pas faciles à étudier. Pour contourner ces difficultés, les haploïdes doublés, les lignées recombinantes et les lignées isogéniques sont utilisés (Semagn *et al.*, 2006b). Ces populations présentent l'avantage d'être homozygotes, donc fixées. A ce titre, elles sont permanentes et peuvent être multipliées ou reproduites sans apparition de modifications génétiques. Elles peuvent donc être distribuées dans plusieurs unités de recherche qui pourront entreprendre les mêmes études de cartographie sur le même type de population (He *et al.*, 2001; Paterson *et al.*, 1996). Mais ces populations présentent aussi des inconvénients. Les haploïdes doublés ne peuvent se développer que pour certaines espèces même si le développement de cette population se fait en un temps très court. Quant aux lignées recombinantes et isogéniques, le temps assez long que nécessite leur création constitue une contrainte majeure. La taille de la population F₂, BC, DH et RIL influence la précision de la carte génétique (Ferreira *et al.*, 2006). En effet, une population de faible taille génère plusieurs groupes de liaisons avec des loci répartis en désordre. Théoriquement, un effectif de 200 individus, quelque soit le type de population, est nécessaire pour construire une carte précise. Dans la pratique, 50 à 250 individus sont requis pour des études préliminaires de cartographie (Mohan *et al.*, 1997) mais un effectif beaucoup plus grand est souhaitable car plus élevé est l'effectif de la population, plus précise sera la carte génétique. Après le développement des populations de cartographie, le phénotypage s'avère l'une des étapes cruciales dans les analyses de QTL. En effet, l'optimisation de la mise en évidence de l'effet des QTL requiert une quantification la plus précise possible de la valeur du caractère. Il est souhaitable de le faire dans des conditions bien contrôlées.

III-1-2 Construction d'une carte génétique

La première étape de la construction d'une carte génétique est le choix du type de marqueurs moléculaires à utiliser. En effet, plusieurs marqueurs peuvent être utilisés dont les plus importants sont AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur de fragment) (Vos P *et al.*, 1995), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur de fragment de restriction) (Botstein *et al.*, 1980) et surtout les milliers de marqueurs microsatellites SSR générés à partir de la séquence génomique du riz (McCouch *et al.*, 2002). L'alignement des génomes indica et japonica a également permis de désigner un grand nombre de marqueurs SNP (Single nucleotide polymorphism) et des marqueurs InDels (insertion-délétion) entre ces deux sous-espèces (Feltus *et al.*, 2004). Enfin, les technologies de puces à ADN sont aussi utilisées. Les premières cartes génétiques ont été construites à

l'aide des marqueurs RFLP (Burr *et al.*, 1988; Helentjaris *et al.*, 1986). Ces marqueurs présentent l'avantage d'être co-dominants, locus-spécifiques et reproductibles. Ils présentent toutefois des limites. En effet, ils sont peu polymorphes. Leur utilisation nécessite une grande quantité d'ADN de très bonne qualité, d'une banque de sondes spécifiques à l'espèce et généralement marqués par des radioéléments. L'application de cette technique de marquage est très laborieuse et très longue. Un marqueur est dit co-dominant lorsqu'il révèle des individus hétérozygotes héritant, des deux parents, des allèles différents alors qu'un marqueur dominant n'est capable de mettre en évidence que des descendants homozygotes héritant du même type d'allèle des deux parents (Figure I-10). Actuellement, les marqueurs microsatellites restent l'idéal pour la construction des cartes génétiques. Ils sont très informatifs. En effet, ils sont co-dominants, locus-spécifiques, très reproductibles et passent facilement pour une technique de routine pour un génotypage à haut débit (Powell *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1999). Les avantages et inconvénients des autres types de marqueurs moléculaires sont aussi bien connus (Semagn *et al.*, 2006a).

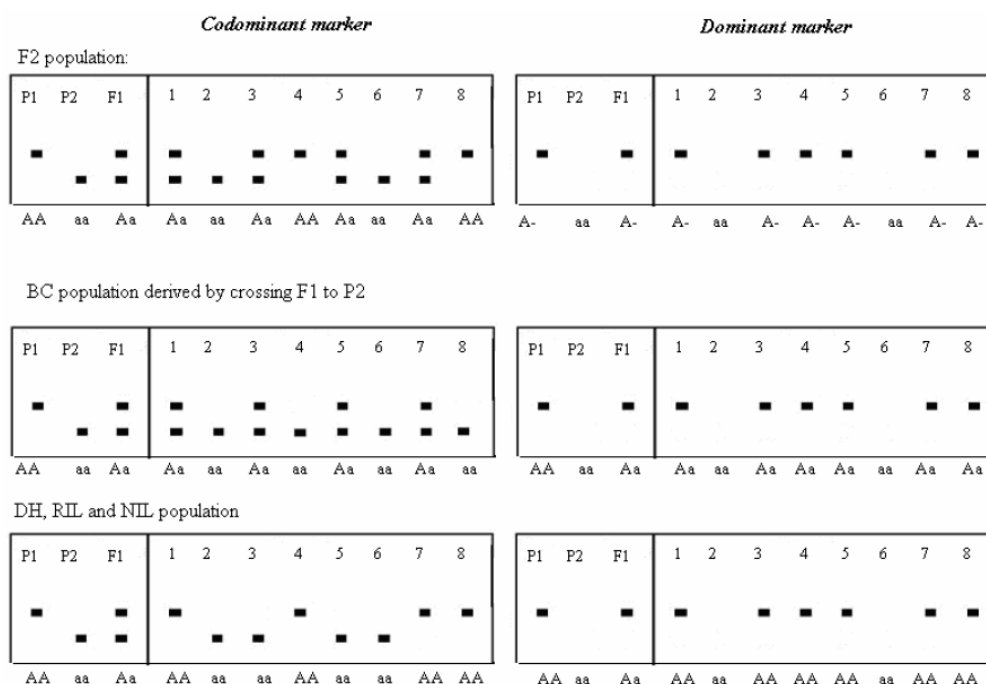


Figure I-10 : Gels illustrant la différence entre marqueurs codominant (à gauche) et dominant (à droite) dans cinq populations de cartographie (Collard *et al.*, 2005). Contrairement aux marqueurs codominants, les marqueurs dominants ne permettent pas de distinguer les génotypes homozygotes des hétérozygotes dans une population F₂. P₁ et P₂ sont les deux parents et les descendants sont numérotés de 1 à 8.

Après le choix du type de marqueur à utiliser, on procède à une étude de polymorphisme entre les parents du croisement. Les marqueurs qui révèlent une différence entre les parents de la population de cartographie sont dits polymorphes. Il faut un grand nombre de marqueurs polymorphes pour obtenir une carte génétique bien saturée, gage d'une grande précision dans la détection des QTLs. Les marqueurs polymorphes identifiés serviront à génotyper toute la population de cartographie. Cette étape requière une attention particulière afin d'éviter des erreurs de codage d'allèles, de données manquantes. Il y va de la précision de la carte. Les individus présentant de nombreuses données manquantes sont peu informatifs et introduiraient des biais dans le calcul des distances génétiques (Van et Voorrips, 2001). Ils sont donc à éliminer.

La dernière étape est l'analyse de liaison et la construction de la carte génétique. Elle s'effectue à l'aide de plusieurs logiciels dont les plus courants sont JoinMap (Stam, 1993a), MAPMAKER/EXP (Lander *et al.*, 1987), GMEDEL (Echt *et al.*, 1992), LINKAGE (Suiter *et al.*, 1983), MapManager QTX (Manly *et al.*, 2001) et MapDisto (Lorieux, 2007). Dans un premier temps, la distorsion de ségrégation est testée. A cet effet, pour chaque marqueur en ségrégation, le test de X^2 se fait pour évaluer l'ampleur de la déviation du ratio de ségrégation attendu pour la population de cartographie. Ce ratio est de 1 :1 pour les marqueurs dominants et co-dominants en BC, RIL, DH et NIL. D'une valeur de 1 :2 :1 pour les marqueurs co-dominant en F_2 , il est de 3 :1 pour les dominants en F_2 . La distorsion de ségrégation est la déviation de la fréquence de génotypes observée de la fréquence de génotypes attendue dans la population en ségrégation (Sandler et Golic, 1985; Lyttle, 1991). Cette distorsion peut être due à un biais statistique, une erreur de génotypage ou de codage d'allèles, une perte de chromosome, une compétition entre gamètes pour une fécondation préférentielle lors du développement de la population de cartographie. Le taux de recombinaison des marqueurs co-dominants est moins affecté par la distorsion de ségrégation que celui des marqueurs dominants (Lorieux *et al.*, 1995a).

Après le test de distorsion de ségrégation, on procède à l'établissement des groupes de liaison. Il repose sur la valeur du LOD « logarithm of odds » ou LOD score qui est le rapport de la probabilité de liaison entre deux marqueurs sur la probabilité que ces deux marqueurs soient indépendants (Risch, 1992). La valeur de LOD « maplod » requise pour que deux marqueurs soient liés est de 3. Un LOD de 3 entre deux marqueurs signifie qu'il est 1000 fois plus probable que ces deux marqueurs soient liés qu'ils ne soient libres. Il est important de vérifier chaque marqueur dans chaque groupe de liaison avant de passer à l'étape suivante qui consiste à assigner chaque groupe de liaison à un chromosome en se basant sur les informations disponibles sur les marqueurs ancrés qui ne sont rien d'autres que des marqueurs dont la localisation chromosomique est déjà connue.

La dernière étape de la construction de la carte génétique est le calcul des distances génétiques et l'établissement de l'ordre des marqueurs. Dans ce

cas, il est important de spécifier un certain nombre de paramètres à savoir : « a recombination threshold value » qui est la valeur-seuil de recombinaison, le minimum « maplod », le « jump threshold value » et le « mapping function ». Le principe de la cartographie est basé sur la construction de la carte en positionnant les marqueurs un par un, en commençant par le marqueur le plus informatif. Si l'ordre de certains marqueurs est déjà connu à l'avance, le logiciel utilise cet ordre comme un ordre fixe auquel il ajoute les autres marqueurs un par un en choisissant chaque fois la meilleure position de chacun des marqueurs. Lorsqu'une distance génétique est inférieure à 10 cM, elle est considérée comme étant égale au taux de recombinaison. Toutefois, cette relation n'est pas applicable dans le cas des distances génétiques supérieures à 10 cM. Dans ce cas, il est crucial de choisir la fonction de cartographie à utiliser entre celle de Haldane et celle de Kosambi qui transforment le taux de recombinaison en distance génétique. Selon la fonction de Haldane (Haldane, 1931), il n'existe pas d'interférence entre les crossing-over qui interviennent lors de la méiose alors que la fonction de Kosambi (Kosambi, 1944) admet un degré d'interférence entre les crossing-over. Selon Kosambi, l'apparition de crossing-over dans une région chromosomique réduit la probabilité d'un autre crossing-over dans la région adjacente. La fonction de Kosambi est recommandée car celle de Haldane surestime les distances génétiques.

III-1-3 Détection de QTL par les méthodes d'analyse classique

III-1-3-1 Analyse simple marqueur

Plusieurs méthodes sont utilisées pour détecter des QTLs. La plus simple est l'analyse simple marqueur qui n'est rien d'autre qu'une analyse de variance (ANOVA). Les moyennes phénotypiques des lignées de chaque classe de marqueur (par exemple AA, Aa et aa) sont comparées. La différence entre deux moyennes fournit une indication sur la contribution de chaque allèle à l'expression du phénotype. Autrement dit, si les différences de génotype à un marqueur entre individus expliquent une part significative des différences phénotypiques entre ces individus, alors ce marqueur est associé à un ou plusieurs QTL. Cette analyse ANOVA est très simple et ne nécessite pas, au préalable, une carte génétique complète. Elle est applicable à de nombreux loci, et offre la possibilité d'insérer de covariables. Cependant, elle présente des inconvénients majeurs: elle ne permet ni de positionner le QTL entre les marqueurs (Figure I-11), ni de calculer son effet réel sur le caractère.

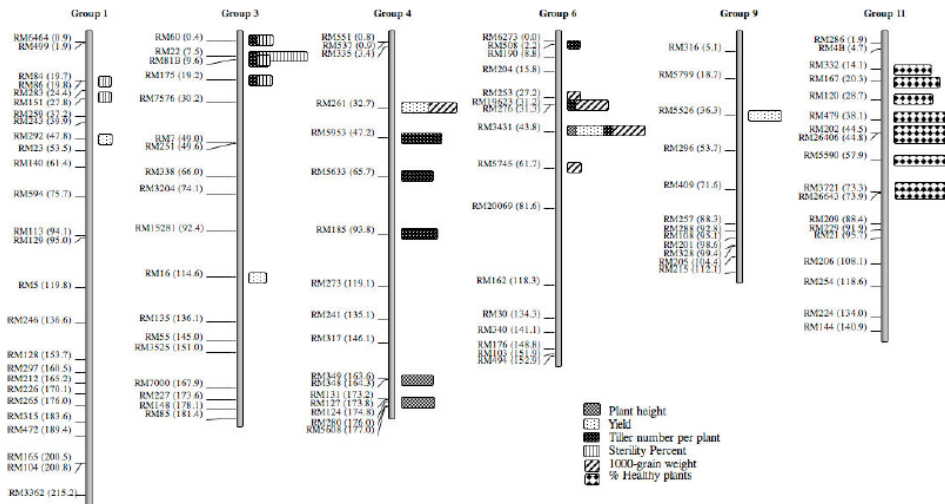


Figure I-11: Exemple de cartographie par ANOVA, de 15 QTLs contrôlant le rendement et la résistance du riz au RSNV. A gauche, les marqueurs SSR avec leurs distances génétiques sur la base de la carte de liaison IR64/TOG5681 développée au CIAT en 2007. A droite, les QTLs identifiés sur les chromosomes 1, 3, 4, 6, 9 et 11 (Andrés Gonzalo Gutiérrez *et al.*, 2010)

III-1-3-2 Cartographie d'intervalle (Interval Mapping)

Cette méthode permet de positionner le QTL entre les marqueurs et de mieux estimer son effet (Lander *et al.*, 1989). Elle nécessite une carte génétique et teste chaque point du génome comme position putative d'un QTL. Sa fiabilité est examinée suivant la méthode de maximum de vraisemblance basée sur un score appelé LOD score, qui explique la probabilité de présence d'un QTL par rapport à la probabilité d'absence de ce QTL en une position donnée du génome. Les QTLs sont généralement retenus au seuil LOD >3. Autrement dit, un QTL n'est retenu que lorsque la probabilité de sa présence est au moins 1000 fois plus grande que celle de son absence. L'insuffisance de cette méthode est son incapacité à détecter plusieurs QTL sur un même groupe de liaison. En effet, les effets combinés de deux QTL liés, introduisent des biais dans l'analyse par cette méthode.

III-1-3-3 Cartographie d'intervalles composés

Encore appelée Composite Interval Mapping (Jansen, 1993 ; Zeng, 2000), cette méthode complexe est plus puissante et plus précise que la cartographie simple par intervalle. En effet, cette méthode teste la position d'un QTL sans considérer les effets des autres QTLs comme variance résiduelle. Elle élimine donc tous les biais que peuvent engendrer les autres QTLs liés à celui dont la position est testée à un moment précis de l'analyse. Cette méthode permet donc de prendre en compte la présence possible de plusieurs QTL sur un même groupe de liaison, sans aucun biais.

III-1-3-4 Cartographie d'intervalles multiples

Cette méthode, encore appelée Multiple Interval Mapping (Kao *et al.*, 1999) permet de détecter plusieurs QTL simultanément. Par rapport à toutes les méthodes d'analyse précédemment décrites, elle présente donc l'avantage de mettre en évidence des effets d'interactions entre QTL (épistasies).

III-1-3-5 Cartographie par les méthodes bayésiennes

Les modèles bayésiens ont été utilisés pour la cartographie de QTL (Satagopan *et al.*, 1996; Uimari et Hoeschele, 1997; Sen et Churchill, 2001; Xu, 2003; Bogdan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005a). Avec ces méthodes, les analyses génèrent des modèles multi-QTL offrant ainsi la possibilité de considérer automatiquement de nombreuses combinaisons de QTL, de positions de QTL et d'effet de QTL. Cependant, elles présentent deux limites majeures que sont la complexité des calculs et l'absence de logiciel simple à utiliser.

III-1-3-6 Autres méthodes d'analyses

Les analyses classiques de QTL sont généralement limitées à de grandes populations bialléliques. Ces analyses reposant essentiellement sur des événements de recombinaison, la taille de la population de cartographie devient un facteur limitant pour la mise en évidence de QTL. Plus la taille de la population est faible, plus réduit sera le nombre d'événements de recombinaisons étudiés, et moins robuste sera l'analyse QTL. Une nouvelle méthode a été développée afin de contourner cette difficulté. Elle combine et compare les données ou les résultats de différentes études de cartographie afin d'optimiser la cartographie. Pour ce faire, elle prend en compte plusieurs populations de la même espèce qui ont été analysées

pour le même caractère. La limite de cette méthode réside dans le fait que les parents de croisement, la structure et la taille des populations, les cartes génétiques et les différentes méthodes de détection peuvent changer d'une étude à l'autre rendant ainsi difficile voire impossible la comparaison entre études ou la combinaison des résultats de plusieurs études. Des logiciels prenant en compte ces éléments pour des analyses intégrées de QTL ont été développés. Ces logiciels permettent notamment la construction de cartes génétiques consensus indispensables pour la comparaison des données obtenues à partir de plusieurs populations génotypées avec différents types de marqueurs. Entre autres logiciels développés, nous pouvons citer JoinMap (Stam, 1993a) ou CarthaGene (Schiex et Gaspin, 1997).

Une autre méthode, la méta-analyse, consiste à faire la synthèse et l'évaluation statistique des résultats de plusieurs expériences, permettant de construire une carte consensus à partir de plusieurs cartographies de QTL. Elle projette sur cette carte les positions des QTLs et permet d'estimer le nombre de QTL différents identifiés pour un caractère donné et de déterminer si un QTL observé dans une population correspond à un QTL observé dans une autre population. Elle conduit généralement à la diminution de l'intervalle de confiance des QTLs identifiés dans différentes populations (Chardon *et al.*, 2004; Veyrieras *et al.*, 2007). La méta-analyse a également des limites car elle considère les QTLs comme additifs et est rendue compliquée par les biais que génèrent les différences entre études dans les techniques expérimentales, les analyses statistiques et les environnements. La méta-analyse se fait à l'aide de logiciels comme MetaQTL (Veyrieras *et al.*, 2007) ou Biomeqator (Arcade *et al.*, 2004). Une méta-analyse sur 313 QTL impliqués dans la date de floraison chez le maïs a conduit à 62 QTL consensus (Chardon *et al.*, 2004). Les projections par syntenie de gènes de riz connus pour être impliqués dans la floraison ont permis de mettre en évidence 19 associations entre gènes candidats et QTL. Ces résultats montrent que la combinaison des méta-analyses de QTL avec des projections basées sur la syntenie avec une plante modèle de référence peut être une stratégie efficace pour l'identification de gènes candidats.

III-1-4 Détection de QTL par la génétique d'association

Une autre méthode de détection des QTLs est la génétique d'association. Son principe est basé sur la recherche dans un ensemble de génotypes (accessions de germplasm ou de variétés cultivées) une association statistique entre la valeur du caractère étudié et les différents allèles au niveau des marqueurs ou des gènes candidats. Par cette méthode, on évalue le changement de la valeur du caractère à la suite de la substitution d'un allèle par un autre. Elle présente plusieurs avantages. D'abord elle ne

nécessite pas le développement de populations de cartographie de grande taille (Morgante et Salamini, 2003) qui est un processus long et coûteux selon les espèces. Ensuite elle offre une résolution génétique potentiellement très importante grâce aux nombreux événements de recombinaison méiotique accumulés au cours de plusieurs générations. Enfin, elle permet de suivre plusieurs allèles fonctionnels par locus. Le facteur le plus important pris en compte par la génétique d'association est le niveau de déséquilibre de liaison (DL) des génotypes étudiés. Lorsque le DL est élevé, l'association marqueur-caractère peut être théoriquement forte avec un nombre de marqueurs moléculaires convenable. En revanche, lorsque le DL est faible, la puissance de détection d'un simple marqueur sera seulement étendue à une petite distance physique. Il y aura donc nécessité d'un grand nombre de marqueurs pour balayer tout le génome. La combinaison de la génétique d'association et de la cartographie génétique classique pourrait donc être nécessaire pour l'identification et la cartographie fine d'un QTL. Pour éviter les faux positifs dans les modèles d'association (Yu J *et al.*, 2006), il est indispensable de prendre en compte la structure des populations. Les faux positifs sont des QTLs statistiquement présents mais qui n'ont aucune réalité biologique. Des niveaux élevés de structure de population existent vraisemblablement chez le riz, en raison de son autogamie, de l'histoire de sa domestication, et de son amélioration génétique. Les marqueurs SNP (McNally *et al.*, 2006) constituent des polymorphismes très intéressants utilisés en génétique d'association de même que la technique de puces à ADN.

III-2 Identification des facteurs impliqués dans les QTLs

III-2-1 Approche génétique par utilisation de lignées quasi-isogéniques

Les populations F_2 , de backcross, les lignées recombinantes et les haploïdes-doublées, souvent utilisées pour la détection de QTL, ne constituent pas de bons matériels pour la cartographie fine des QTLs. Seules des lignées quasi-isogéniques (NIL, *near isogenic lines*) sont appropriées à la cartographie fine de QTL. Ces lignées quasi-isogéniques sont conçues pour ne se différencier que pour la région qui porte le QTL cible : c'est l'isogénisation ou mendélisation du QTL. La comparaison de ces lignées pour le caractère étudié revient donc à mesurer l'effet du QTL. Ces lignées peuvent être créées par deux processus à savoir l'introgession et l'utilisation des résidus d'hétérozygotie.

L'introgession est la stratégie la plus utilisée. Elle consiste à transférer le fragment chromosomique porteur du QTL cible du parent donneur (ou d'une lignée appropriée) dans le fond génétique du parent récurrent par rétrocroisements successifs. La lignée d'introgession (IL, introgression

line) créée est ensuite comparée au parent récurrent pour mesurer l'effet du QTL sur le caractère étudié. L'idée de généraliser cette stratégie à tout le génome entier a été concrétisée par le développement d'un type nouveau de population appelée lignées de substitution en segment chromosomique (CSSL, chromosome segment substitution line). L'utilisation directe des CSSL pour la cartographie génère des QTLs avec une puissance statistique de détection plus élevée que celle d'autres types de populations. L'avantage qu'offre ce type de population, est que les QTLs peuvent être ensuite comparés entre eux dans un fond génétique homogène et quasi-identique. Les lignées d'introgression et les CSSL peuvent être croisées entre elles ou avec le parent récurrent pour la cartographie fine et le clonage positionnel de QTL. Elles peuvent aussi être directement utilisées dans les programmes d'amélioration génétique (Zamir, 2001). Environ vingt mille lignées recombinantes ont été générées dans trois fonds génétiques de lignées élites à partir de 195 accessions de riz donneuses (Li *et al.*, 2001). De même, de nombreuses populations CSSL ont été développées chez le riz, à partir de croisements intra-spécifiques *O. sativa* x *O. sativa* (Ebitani *et al.*, 2005; Xi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007) et inter-spécifiques *O. sativa* x *O. glaberrima* (Doi *et al.*, 2007; Lorieux communication personnelle).

Les lignées recombinantes en cours de fixation présentent des résidus d'hétérozygotie. Ces résidus peuvent être aussi utilisés pour créer des NIL. La stratégie consiste à sélectionner les lignées hétérozygotes au niveau d'un locus cible et de créer à partir de ces lignées et par autofécondation, des familles HIF (heterogeneous inbred families) (Halley *et al.*, 1994). Dans ce cas, chaque famille est constituée de lignées quasiment fixées et presque identiques entre elles. Ces lignées sont différentes les unes des autres par leur allèle au niveau de ce locus (Boisnard *et al.*, 2007). La comparaison des phénotypes des lignées d'une même famille mais porteuses d'allèles différents au locus cible met en évidence l'effet du QTL putatif à ce locus. Cette approche a été utilisée avec succès (Tuinstra *et al.*, 1997; Loudet *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2006).

Comme dans le cas des lignées d'introgression et des CSSL, les NILs peuvent servir de parents donneurs pour développer des populations où un seul QTL ségrège comme simple facteur mendélien. Ces populations peuvent être utilisées pour la cartographie fine par les techniques standards de clonage positionnel. Cette démarche peut aboutir à l'identification de multiple sous-QTLs à partir d'un QTL précédemment identifié. Ce fut le cas des QTLs impliqués dans la date de floraison Hd3 (Mona *et al.*, 2002) et dth1-1 (Thomson *et al.*, 2006). De ces résultats il se dégage que l'architecture d'un caractère phénotypique pourrait être plus complexe que ce qui est observé lors d'une cartographie de QTL. La précision de la cartographie de QTL a fait l'objet d'une étude (Price, 2006) qui a aboutit à la conclusion selon laquelle la cartographie de QTL est précise à moins de 2 cM près. Au regard de ces résultats, le clonage positionnel de QTL pourrait être envisagé dans certains cas sans passer

par la cartographie fine qui est longue et coûteuse. C'est le cas de plusieurs QTLs de résistance à la pyriculariose cartographiés à moins d'un centimorgan de marqueurs microsatellites (Jia *et al.*, 2011).

III-2-2 Accès au contenu en gènes et identification de gènes candidats

En général les QTLs identifiés ont un intervalle de confiance relativement large de plusieurs centimorgans. Mais lorsque ce dernier approche le centimorgan, la cartographie fine et l'accès au contenu en gènes de la région candidate nécessitent une carte physique qui pourrait être la séquence génomique ou un BAC (bacterial artificial chromosome) contig qui couvre toute la région du QTL. Les séquences d'extrémité de BAC étant une source de marqueurs génétiques, la carte physique permettra donc de générer de nouveaux marqueurs spécifiques de la région du QTL. Pour accéder au contenu en gènes de la région candidate, on peut donc utiliser des annotations de gènes de la séquence génomique existante, ou bien séquencer et annoter des BAC ou encore utiliser la colinéarité entre l'espèce étudiée et une espèce modèle. Chez le riz, de nombreuses données génomiques sont disponibles. Un gène est candidat lorsqu'il cosegrége avec le QTL (gène candidat positionnel) ou lorsque sa fonction biochimique est en relation avec la physiologie du caractère étudié (gène candidat fonctionnel) (Pflieger *et al.*, 2001). Les gènes candidats sont le plus souvent obtenus à partir des résultats d'études réalisées sur les organismes modèles tels que l'arabidopsis et le riz. C'est le cas, chez le riz, de trois QTL impliqués dans la date de floraison (Hd1, Hd3a, Hd6) dont l'identification a été faite par des gènes candidats dont les fonctions avaient été révélées par des études chez *Arabidopsis thaliana* (Yano *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 2002). L'approche gène candidat peut être entreprise sur une région particulière (Wang *et al.*, 2005b) ou à l'échelle du génome entier pour plusieurs QTL (Ramalingam *et al.*, 2003). Le profil d'expression d'un gène peut donner une indication sur son implication dans un QTL. Plusieurs QTL sont connus pour mettre en jeu une différence d'expression entre les allèles d'un gène. Dans ce cas, la mise en évidence des gènes d'une région candidate se fait systématiquement par PCR quantitative. De même, des outils comme CMTV (Sawkins *et al.*, 2004) ou des bases de données telles que PlantQTL-GE (Zeng *et al.*, 2007) ou Rice PIPELINE (Yazaki *et al.*, 2004) permettent de relier la position des QTLs à des données d'expression.

III-2-3 Validation des gènes candidats

Après l'identification des gènes candidats, leur validation fonctionnelle s'avère indispensable pour confirmer ou infirmer leur implication dans un QTL. Cette validation peut se faire par différentes approches :

*soit par sur-expression ou répression du gène cible à travers des transformations génétiques stables ou RNAi (Waterhouse et Helliwell, 2003)

*soit par complémentation génétique d'un mutant connu (Doebley *et al.*, 1997)

*soit par la génétique inverse lorsque des populations étiquetées avec un ADN-T ou un transposon (Maes *et al.*, 1999) ou des populations TILLING (*targeting induced local lesions in genomes*) (McCallum *et al.*, 2000) sont disponibles. Le TILLING et le RNAi sont très puissants et très informatifs car les changements qu'ils induisent dans la fonctionnalité du gène sont comparables à ceux observés naturellement.

Quelles que soient les approches utilisées pour la validation de gène, le fond génétique utilisé ou dans lequel un mutant est disponible est déterminant tout comme la connaissance du ou des polymorphismes responsables du QTL se révèle être très utile lors du choix de la stratégie de validation.

La cartographie fine ou le clonage positionnel de QTL chez les plantes est effective mais paraît couteuse, laborieuse et contraignante au regard des différentes étapes et méthodologies précédemment décrites. Les avancées génomiques et les séquences génomiques disponibles la rendent plus facile chez les plantes dont le génome est séquencé, notamment le riz.

IV- Inventaire des gènes et QTLs de résistance préalablement identifiés contre les souches Asiatiques de *Xoo*.

Au total 35 gènes et 17 QTLs de résistance ont été identifiés contre différentes souches Asiatiques de *Xoo* (Ramalingam *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2008; Cheema *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2008; Korinsak *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011) dont une vingtaine déjà cartographiés. Treize de ces gènes parmi lesquels *xa5*, *xa8*, *xa13*, *xa15*, *xa19*, *xa20*, *xa24*, *xa25*, *xa26*, *xa28*, *xa31(t)*, *xa33(t)* et *xa34* sont récessifs (Wu *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2008; Korinsak *et al.*, 2009). Parmi les 35 gènes de résistance décrits, 7 ont été clonés. Il s'agit des gènes *Xa21* (Song *et al.*, 1995), *Xa1* (Yoshimura *et al.*, 1998), *Xa26* (Sun *et al.*, 2004), *Xa27* (Gu *et al.*, 2004), *Xa3* (Xiang *et al.*, 2006), *xa5* (Iyer et McCouch 2004) et *xa13* (Chu *et al.*, 2006). Les produits d'expression de la plupart des gènes dominants sont des récepteurs qui interagissent directement ou indirectement avec les éliciteurs de la bactérie. Cette interaction conduit à des réactions d'hypersensibilité HR (Martin *et al.*, 2003).

Le premier gène de résistance cloné, *Xa21*, a été identifié chez l'espèce sauvage de riz Africain *Oryza longistaminata* (Khush *et al.* 1990) et cartographié sur le bras long du chromosome 11 (Ronald *et al.*, 1992). Il est efficace contre de nombreux isolats de *Xoo* (Khush *et al.*, 1990) et est largement utilisé dans plusieurs programmes d'amélioration. *Xa21*

appartient à une grande famille de gènes conservés chez les plantes et les animaux et qui sont impliqués dans la reconnaissance de l'agent pathogène lors du processus d'infection (Dardick et Ronald 2006). Il code pour une protéine ayant un domaine extracellulaire riche en séquences répétées de leucine (LRR) et un domaine interne fait de kinase (Song *et al.*, 1995). Le domaine LRR joue un rôle important dans la reconnaissance de l'agent pathogène (Wang *et al.*; 1998). L'expression de *Xa21* se fait de façon constitutive au cours du développement de la plante et la résistance qu'elle induit se maintient à tous les stades de développement de la plante (Lee *et al.* 1999). Mais l'action de *Xa21* devient beaucoup plus efficace seulement à l'âge adulte de la plante (Century *et al.* 1999). L'activité de *Xa21* est donc contrôlée au cours des différents stades de développement de la plante. Ce contrôle ne dépend pas de la stabilité du produit d'expression de *Xa21* car la protéine XA21 est beaucoup plus stable dans les jeunes plantules (Xu *et al.*, 2006).

Tout comme *Xa21*, le gène de résistance *Xa26* a aussi un large spectre d'action. Il est efficace contre de nombreuses souches bactériennes différentes de celles de *Xa21*. Identifié chez le cultivar asiatique Minghui 63 de la sous-espèce indica, *Xa26* a été physiquement cartographié dans un fragment de 20 kb (Yang *et al.*, 2003). Il possède également un domaine interne fait de kinase et un domaine extracellulaire LRR composé de 26 répétitions (Sun *et al.*, 2004) contrairement aux 23 répétitions de *Xa21*. Les deux protéines XA21 et XA26 détecteraient différents signaux. De même que *Xa21*, *Xa26* s'exprime de façon constitutive, mais son activité ne dépend pas du stade de développement de la plante (Sun *et al.*, 2004), comme ce fut le cas de *Xa21*. Elle est toutefois influencée par le fond génétique de la variété du riz dans lequel, le gène s'exprime (Sun *et al.*, 2004).

Xa3 a été identifié dans les variétés cultivées Chugoku45 and Was Aikoku de la sous-espèce japonica et cartographié sur le bras long du chromosome 11 (Xiang *et al.*, 2006). Sa fonction dépend aussi bien du fond génétique dans lequel il s'exprime que par le stade de développement de la plante. Parmi tous les gènes de la famille de *Xa26*, *Xa3* ne co-ségrège qu'avec les marqueurs de *Xa26*. La comparaison de phénotypes a montré que les lignées de riz porteuses de *Xa26* ou de *Xa3* développent des réactions d'hypersensibilité, ce qui n'est pas le cas d'autres lignées. *Xa3* et *Xa26* sont donc considérés comme des allèles d'un même gène (Xiang *et al.* 2006). Le produit d'expression de *Xa3/Xa26* et celui de l'allèle sensible *xa3/xa26* ont 92% d'homologie de séquence et ne diffèrent qu'au niveau de domaine riche en séquence répétée de leucine LRR (Xiang *et al.*, 2006).

L'autre gène cloné *Xa1* a été identifié chez la variété Kogyoku de la sous-espèce indica et cartographié sur le chromosome 4 (Yoshimura *et al.*, 1992; Yoshimura *et al.*, 1996). Il code pour une protéine ayant un domaine LRR et un site de fixation de nucléotides NBS (Nucleotide Binding Site) (Yoshimura *et al.*, 1998). Son expression n'est pas constitutive mais plutôt induite.

Le gène récessif *xa5* quant à lui, a été identifié dans la variété DZ192 (Petpisit *et al.*, 1977). Il est situé sur le bras court du chromosome 5 (Yang *et al.*, 1998; Blair *et al.*, 2003) et code pour la sous-unité gamma du facteur de transcription TFIIA (TFIIA γ , ou *Xa5*) (Iyer et McCouch 2004). *xa5* est partiellement dominant. Son produit d'expression diffère de celui de l'allèle sensible par la substitution de la valine par l'acide glutamique en position 39. TFIIA stabilise la fixation des protéines à la boîte TATA et joue un important rôle dans l'activation de la transcription. Il fonctionne comme un anti-répresseur ou un co-activateur. Pour une meilleure compréhension de la fonction de *xa5*, plusieurs modèles ont été proposés. Iyer and McCouch (2004), dans un premier temps, pensent que la protéine codée par l'allèle de résistance *xa5* interagirait avec le domaine AAD de la protéine d'avirulence *Avrxa5* et empêcherait la transcription du gène de virulence dans la cellule hôte. En absence de *xa5*, *Avrxa5* agirait comme un facteur de transcription capable de se fixer directement au promoteur de l'allèle de sensibilité *Xa5* dont la transcription conduit à la maladie. Une plante homozygote *xa5xa5* produit deux fois plus de protéines de virulence *XA5* qui interagit avec la protéine d'avirulence *Avrxa5*, qui, par conséquent, n'est plus disponible pour induire la transcription de l'allèle de sensibilité. L'induction de la résistance par *xa5* dépend donc de la proportion de la protéine de virulence *XA5*. Jiang *et al.* (2006) pensent que les allèles *xa5* et *Xa5* ont des affinités différentes pour les activateurs et suppresseurs de gènes de défense. Selon eux, *Avrxa5* serait un activateur de transcription de gènes de défense et interagirait mieux avec *xa5* qu'avec *Xa5*, *Xa5* se fixant préférentiellement aux suppresseurs. Chacune de ces hypothèses est compatible avec le caractère récessif (Blair *et al.*, 2003) ou semi dominant (Li *et al.*, 2001) de ce gène.

Récemment, le gène de résistance *Xa27* tout comme la protéine d'avirulence *AvrXa27* ont été caractérisés. *Xa27* a été cartographié sur le chromosome 6 du riz sauvage *O. minuta* (Gu *et al.*, 2004). C'est un nouveau gène de résistance dont les caractéristiques sont très différentes de celles de tout autre gène de résistance chez les plantes (Gu *et al.*, 2005b). Sa caractérisation a montré que l'allèle résistant et l'allèle sensible codent pour la même protéine apoplastique (Wu *et al.*, 2008b; Tian et Yin 2009). Toutefois, seule l'expression de l'allèle résistant *Xa27* joue un rôle important au cours de l'infection : il provoque l'épaississement de la paroi secondaire des cellules du xylème et confère donc une résistance aux souches virulentes de *Xoo*. La différence entre les deux allèles est leur expression ou non expression en réponse à *AvrXa27*.

xa13, le gène récessif récemment cloné, confère la résistance à la race 6 de *Xoo* d'origine Philippine, la race la plus virulente à tous les gènes de résistance au BB connus. Il a été identifié chez la variété du riz asiatique BJI (Ogawa et Yamamoto 1987) et cartographié sur le bras long du chromosome 8 (Zhang *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1999). Sa cartographie fine le localise dans un intervalle de 14,8kb. Il est de la famille des nodulines, une autre famille de gènes de résistance de fonction différente

(Chu *et al.*, 2006). Il ne confère la résistance qu'à l'état homozygote. Tout comme *Xa27*, l'expression différentielle de *xa13* en réponse à l'agent pathogène résulte du polymorphisme de la région du promoteur qui permet de distinguer l'allèle fonctionnel et l'allèle non fonctionnel de *xa13* (Chu *et al.*, 2006b). Contrairement à *Xa27*, l'allèle fonctionnel *xa13* a une faible expression au cours de l'infection alors que l'allèle non fonctionnel *Xa13* est induit. Cette induction de l'allèle dominant *Xa13* est indispensable au développement de la maladie (Yang *et al.*, 2006). *xa13* est récessif et suggère que l'allèle dominant *Xa13*, non fonctionnel, peut être considéré comme allèle de sensibilité ciblé par *Xoo*. Tous ces gènes et ceux non clonés sont récapitulés dans le tableau I-2

Tableau I-2 : Les différents gènes de résistance aux souches asiatiques de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Nom d'accension	Numéro IRGC d'accension	Sous-espèce	Origine	R gene	Chromosome	Reference
Kogyoku	66978	japonica tempéré	Japan	<i>Xa1</i>	4	Yoshimura et al. 1998
Tetep	IRTP 463; 32576	Indica	Vietnam	<i>Xa2</i>	4	Oryzabase,2006
Wase Aikoku	525	Japonica	Japan	<i>Xa3</i>	11	Oryzabase,2006
TKM6	237	Indica	India	<i>Xa4</i>	11	Wang et al. 2001
DZ192	8518	Aus	Bangladesh	<i>xa5</i>	5	Iyer and McCouch,2004
Zenith	4038	-	U.S.A.	<i>Xa6/Xa3</i>	ND	Sidhu et al., 1978
DV85	8839	Aus	Bangladesh	<i>Xa7</i>	6	Sidhu et al. 1978
PI231129	11114	-	U.S.A.	<i>xa8</i>	7	Sidhu et al. 1978
Khao Lay Nhay	23452	-	Laos	<i>xa9</i>	ND	Singh et al. 1983; Ogawa et al. 1988
CAS209	15793	-	Senegal	<i>Xa10</i>	11	Oryzabase 2006; Yoshimura <i>et al.</i> 1983
IR8, IR944	10320	Indica	Philippines	<i>Xa11</i>	ND	Oryzabase,2006
Kogyoku	66978	Japonica tempéré	Japan	<i>Xa12</i>	4	Ogawa 1987
BJ1	3711	-	India	<i>xa13</i>	8	Oryzabase 2006; Ogawa et al. 1988
TN1	105	Japonica	Taiwan	<i>Xa14</i>	ND	Oryzabase 2006; Sidhu et al. 1978
XM41	.*	-	-	<i>Xa15</i>	ND	Gnanamanickam et al. 1999
Tetep	IRTP 463; 32576	Indica	Vietnam	<i>Xa16</i>	ND	Oryzabase 2006
Asominori	55424	Japonica	South Korea	<i>Xa17</i>	ND	Oryzabase 2006
IR24, Toyonishiki	19907, 36818	indica, japonica	Philippines, Japan	<i>Xa18</i>	ND	Liu et al. 2004, Oryzabase 2006
XM5	-	Mutant	-	<i>xa19</i>	ND	Lee et al. 2003, Oryzabase 2006
XM6	-	Mutant	-	<i>xa20</i>	ND	Lee et al. 2003, Oryzabase 2006
<i>O. longistaminata</i>		Sauvage	Africa, Mali	<i>Xa21</i>	11	Song et al. 1995
Zhachanglong	-	-	China	<i>Xa22(t)</i>	ND	Oryzabase 2006, Sun et al. 2004
<i>O. rufipogon</i>	-	Sauvage	China/Cambodia	<i>Xa23</i>	11	Zhang et al. 1998, 2001
DV86, DV85, Aus295	8840, 8839, 29083	Aus	Bangladesh	<i>xa24</i>	ND	Khush and Angeles 1999; Lee et al. 2000
HX-3, Minghui63	-	Indica	China	<i>Xa25(a) and (b)</i>	4,12	Gao et al. 2001 ; Chen et al. 2002 ; Lui et al. 2011
Minghui 63	-	Indica	China	<i>Xa26</i>	11	Sun et al. 2004

Nom d'accesion	Numéro IRGC d'accesion	Sous-espèce	Origine	R gene	Chromosome	Reference
<i>O. minuta</i>	101141	Sauvage	Philippines	<i>Xa27</i>	6	Gu et al. 2004, 2005
Lota Sail	26719	Indica	Bangladesh	<i>xa28</i>	ND	Lee et al. 2003
<i>Oryza officinalis</i>		Sauvage		<i>Xa29</i>	1	Tan et al. 2004
<i>O. nivara</i>	81825	Sauvage	India	<i>Xa30(t)</i>	4	Cheema et al. 2008
Zhachanglong	-	Japonica	China	<i>Xa31(t)</i>	4	Wang et al. 2009
<i>O. australiensis</i> (C4064)	-	Sauvage	-	<i>Xa32(t)</i>	11	Zheng et al. 2009
Ba7	-	-	Thailand	<i>xa33(t)</i>	6	Korinsak et al. 2009
BG1222	-	Indica	Sri Lanka	<i>xa34(t)</i>	1	Chen et al. 2011
<i>O. minuta</i>	101133	Sauvage	Philippines	<i>Xa35</i>	11	Guo et al. 2010
C4059	-	-	China	<i>Xa36(t)</i>	11	Miao et al. 2010

Chapitre II

Identification de sources de résistance aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* chez le riz africain *Oryza glaberrima*

Résumé

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* est l'agent pathogène de la bactériose vasculaire du riz, l'une des maladies les plus dévastatrice du riz à travers le monde. Les souches Africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) sont génétiquement différentes de celles d'Asie. Trois nouvelles races de *Xoo* ont été identifiées et caractérisées en Afrique de l'ouest. Dans cette étude, 107 accessions de riz cultivé africain *Oryza glaberrima* ont été évaluées, en conditions contrôlées sous serre, pour leur résistance à la bactériose. Les plantes âgées de six semaines sont inoculées en serre à l'IRD Montpellier/France avec cinq différentes souches de *Xoo* originaires du Burkina, du Mali et du Niger appartenant aux différentes races A1, A2 et A3. La souche Asiatique PXO86 (Phil race 2) a été aussi utilisée. La plupart des accessions d'*O. glaberrima* sont très sensibles aux souches *Xoo* du Burkina-Faso. Toutefois, 20 et 36 accessions sont respectivement résistantes aux souches du Mali et des Philippines. Les techniques de « CAPS markers » et de « dot blot » ont été respectivement utilisées pour la détection des gènes de résistance *xa5* et *Xa21*. Les résultats montrent que le riz *O. glaberrima* constitue une base génétique étroite pour la résistance à *Xoo*. Cette résistance n'est gouvernée ni par *xa5*, ni par *Xa21*. Les sources de résistance identifiées dans cette étude pourront être utilisées dans des programmes d'amélioration variétale en vue de développer des variétés de riz résistantes à la bactériose vasculaire en Afrique de l'ouest.

I- Introduction

L'une des maladies les plus importantes qui affecte le riz est la bactériose vasculaire (BB), provoquée par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Cette maladie, qui apparaît sous forme de flétrissement au stade juvénile et de brûlure à l'âge adulte de la plante, affecte sévèrement la production de riz dans le monde entier (Mew, 1987; Mew *et al.*, 1993). Elle est particulièrement répandue dans les zones irriguées et les bas-fonds et peut occasionner des pertes de rendement de 20 à 30% pouvant même atteindre 50% dans certaines régions d'Asie (Adhikari *et al.*, 1995). La maladie a été signalée dans les années 80 en Afrique (Reckhaus, 1983). La récente intensification de la production rizicole en l'absence de cultivars résistants a contribué à l'expansion de la maladie en Afrique. En 2003 et, plus récemment, en 2009, un échantillonnage intensif dans trois pays de l'Afrique de l'ouest à savoir le Burkina, le Mali et le Niger a mis en évidence une incidence très élevée de la bactériose vasculaire (Sere *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2007). En Asie, l'utilisation de variétés résistantes est le meilleur moyen de lutte contre la maladie. Il est donc urgent de développer des variétés de riz résistantes au BB à travers différents programmes de sélection en Afrique de l'ouest. A ce jour, une trentaine de gènes de résistance au BB ont été identifiés (Lee *et al.*, 2003) dont six (*Xa1*, *xa5*, *xa13*, *Xa21*, *Xa26/Xa3* et *Xa27*) clonés. Ces gènes clonés et caractérisés codent pour différents types de protéines, ce qui suggère l'existence de multiples mécanismes de résistance de la plante à *Xoo* (Wang *et al.*, 1996 ; White et Yang, 2009).

La sélection assistée par marqueurs (SAM) pour les gènes récessifs n'est toujours pas efficace. En effet, elle implique l'utilisation de marqueurs qui sont indirectement liés au gène cible et qui peuvent se dissocier du gène suite à des recombinaisons. C'est pour cela que récemment, des marqueurs fonctionnels basés sur le polymorphisme simple nucléotide, et définis dans les gènes, ont été développés notamment pour *xa5*, *xa13* et *Xa21* (Iyer et McCouch, 2007). Pour faciliter la SAM, des techniques non couteuses telles que le « dot blot » ont été développées (Shirasawa *et al.*, 2006). L'introgression récente de *xa5*, *xa13* et *Xa21*, par la SAM, dans des variétés élites de riz a été effectuée avec succès (Sundaram, 2009 ; Kottapalli *et al.*, 2010).

La caractérisation génétique d'une collection de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a révélé que les souches africaines de *Xoo* sont génétiquement éloignées de celles d'Asie (Gonzalez *et al.*, 2007). En effet, les souches africaines comportent un nombre réduit de gènes activateurs de transcription (TAL) et de séquences d'insertion dans leur génome (Gonzalez *et al.*, 2007). Une race est un ensemble de souches ayant le même phénotype de virulence ou d'avirulence vis-à-vis d'un ensemble de cultivars hôtes. Trois nouvelles races de *Xoo* d'origine africaine ont été caractérisées : ce sont les races A1, A2 et A3 (Gonzalez *et al.*, 2007). La race A1 est présente au Burkina, au Cameroun et au Niger. Elle est

virulente sur des lignées iso-géniques de riz portant les gènes *Xa3*, *xa8*, *Xa10*, *Xa11*, *xa13*, *Xa14* et *Xa21* et avirulente sur des lignées portant *Xa4*, *xa5* et *Xa7*. Les races A2 et A3 sont présentes respectivement au Burkina et au Mali. Les races A2 et A3 diffèrent par leur réaction sur la lignée parentale IR24. A2 est virulente alors que A3 est avirulente (Gonzalez *et al.*, 2007).

Oryza glaberrima ($2n = 24$, AA) est une espèce cultivée de riz africain. Elle a été domestiquée à partir de l'espèce sauvage *O. barthii* (syn. *O. breviligulata*) il y a environ 1500 ans en Afrique de l'ouest dans le delta du Niger. Elle est isolée de l'espèce cultivée asiatique *O. sativa* par la barrière de reproduction et présente une diversité génétique plus faible que celle de *O. sativa* (Oka, 1958 ; Second, 1982). *Oryza glaberrima* a été progressivement abandonnée en faveur d'*O. sativa*, introduit en Afrique pour son rendement très élevé (Jones *et al.*, 1997). Néanmoins, *O. glaberrima* demeure une culture marginale dans certaines régions du Burkina, de la Guinée et du Mali où il s'adapte aux conditions défavorables. En effet, *O. glaberrima* possède de nombreux caractères d'intérêts tels que la compétitivité aux mauvaises herbes, la tolérance à la sécheresse (Maji *et al.*, 2001), à la submersion, à l'acidité du sol, à la salinité et la toxicité ferreuse (Sahrawat et Sika, 2002) et alumineuse (Baggie *et al.*, 2002). Il est aussi reconnu comme résistant à de nombreuses maladies telles que la panachure jaune du riz (Ndjondjop *et al.*, 1999 ; Albar *et al.*, 2006 ; Thiémélé *et al.*, 2010), la pyriculariose (Silue et Notteghem, 1991), les nématodes (PlowRight *et al.*, 1999 ; Lorieux *et al.*, 2003), les foreurs de tiges et la cécidomyie de galle (Williams *et al.*, 1999 ; Nwilene, 2002). Récemment, des accessions résistantes de *O. glaberrima* aux souches indiennes de *Xoo* ont été identifiées (Vikal *et al.*, 2007). De nombreux caractères d'*O. glaberrima* et le rendement élevé de *O. sativa* ont été combinés dans des lignées interspécifiques, NERICA « New Rice for Africa » (Jones *et al.*, 1997). Malgré les gènes de résistance *Xa* identifiés contre les souches asiatiques de *Xoo* et qui pourraient être utilisés, des sources de résistance spécifiques aux souches africaines de *Xoo* manquent cruellement. Ces sources de résistance permettront de développer des variétés de riz résistantes nécessaires à une production durable en Afrique de l'ouest. L'objectif de ce travail est d'évaluer une « core collection » d'*O. glaberrima* pour leur résistance aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et d'étudier la base génétique de cette résistance.

II- Matériels et méthodes

II-1 Matériels évalués

Un total de 107 accessions d'*O. glaberrima* (Figure II-1) provenant de neuf pays africains et ayant des caractères d'intérêt agronomiques tels que la tolérance à la sécheresse et la résistance aux maladies ont été fournies par la banque de gènes du centre du riz pour l'Afrique. Parmi ces accessions, figurent MG12 (accession IRGC103544) et CG14 (accession IRGC96717) qui ont été utilisées pour développer de nouvelles ressources de riz interspécifique telles que les NERICA au centre du riz pour l'Afrique. Certaines de ces accessions ont fait l'objet d'étude de diversité génétique à l'aide marqueurs moléculaires microsatellites (Semon *et al.*, 2005). Huit variétés d'*O. sativa* composées de 6 indica (IR24, IR64, ITA212, ITA306, BG90-2, Kogoni) et deux japonica (Azucena et WAB165) ont été également évaluées. Azucena et IR64 sont respectivement les témoins sensible et résistant.

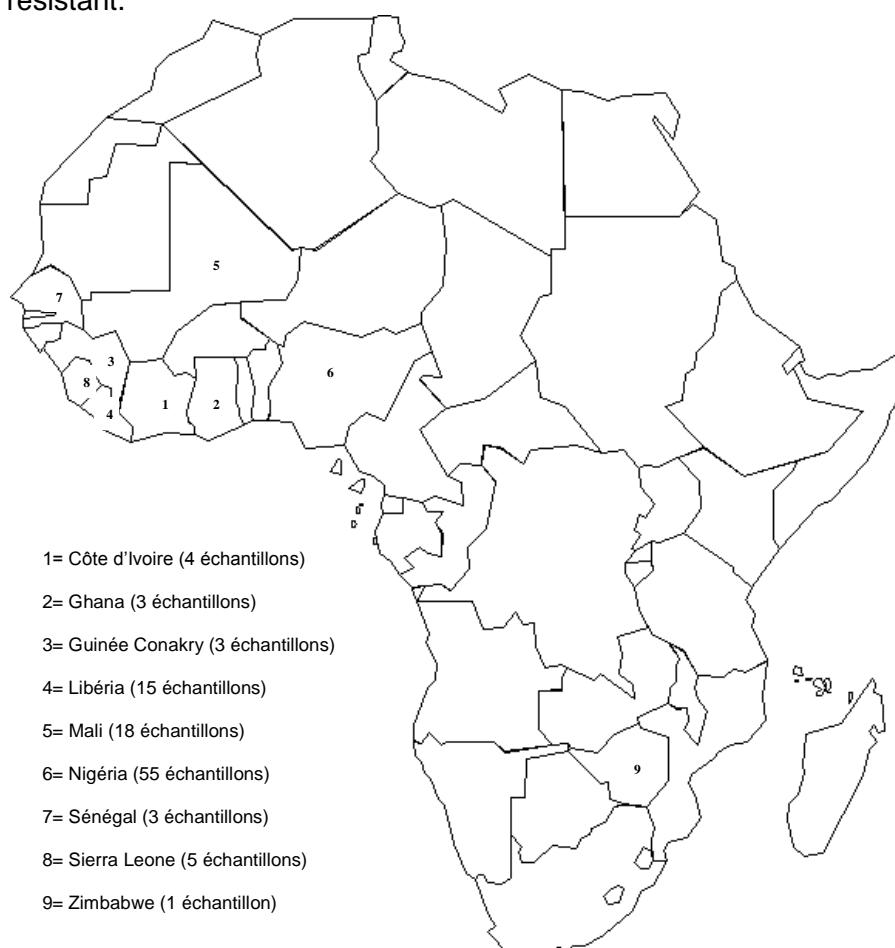


Figure II-1: Origines géographiques et nombre des accessions d'*Oryza glaberrima* évaluées pour leur résistance aux souches Africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

II-2 Inoculation et évaluation de la maladie

Cinq souches africaines de *Xoo* ont été utilisées pour le criblage phénotypique. Il s'agit de BAI3 et BAI4 du Burkina appartenant respectivement à la race A1 et la race A2, la souche MAI1 de la race A3 provenant du Mali. Les souches NAI8 (race A1) du Niger et CFBP1949 (race A3) du Mali ont été testées sur un sous-ensemble de 10 accessions d'*O. glaberrima*. Une souche asiatique PXO86 appartenant à la race 2 des Philippines a été aussi utilisée. Toutes les bactéries sont stockées dans le glycérol à -80°C. Quatre jours avant l'inoculation, les bactéries sont sorties de -80°C et étalées sur du milieu de culture PSA (peptone, sucrose agar) coulé dans des boîtes de pétri. Le milieu PSA est préparé en mettant dans un litre d'eau distillée, 10g de peptone, 10g de sucrose, 1g d'acide glutamique et 16g de bacto agar. Le pH du milieu est ajusté à 7. Il est ensuite autoclavé à 120°C pendant 1h30 min. 24h avant l'inoculation, les colonies bactériennes sont repiquées de nouveau sur milieu PSA. L'inoculum est préparé par suspension de colonies bactériennes fraîches dans de l'eau distillée stérile. Sa concentration mesurée au spectrophotomètre à une densité optique de 600 nm est de 0,2 correspondant à 10⁸ CFU/ml. L'inoculation a été faite à l'IRD/Montpellier en conditions contrôlées en serre sous 80% d'humidité relative, 28°C et 10h à 12h de lumière par jour. Les plantes âgées de six semaines sont inoculées par la méthode de leaf-clipping (Kauffman *et al.*, 1973). Elle consiste à immerger une paire de ciseaux dans l'inoculum bactérien et à couper l'extrémité de deux jeunes feuilles de la plante (Figure II-2). La longueur de lésion de feuille induite par la bactérie est mesurée 21 jours après inoculation. Lorsque la longueur de lésion (LL) est inférieure à 5 cm, la plante est dite résistante (R). Elle est modérément résistante si LL est comprise entre 5 et 10 cm, modérément sensible avec une LL comprise entre 10 et 15 cm. Toute plante dont la LL est supérieure à 15 cm est considérée comme sensible. La virulence est la capacité de la bactérie à infecter une plante. Elle est basée sur une échelle de longueur de lésion précédemment décrite par Vikal Y *et al.* (2007). Selon cette échelle, 0 = absence de lésion ; 1 = LL comprise entre 1 et 3 cm ; 2 = LL comprise entre 4 et 7 cm ; 3 = LL comprise entre 8 et 12 cm ; 4 = LL comprise entre 13 et 18 cm ; 5 = LL supérieure ou égale à 19 cm.

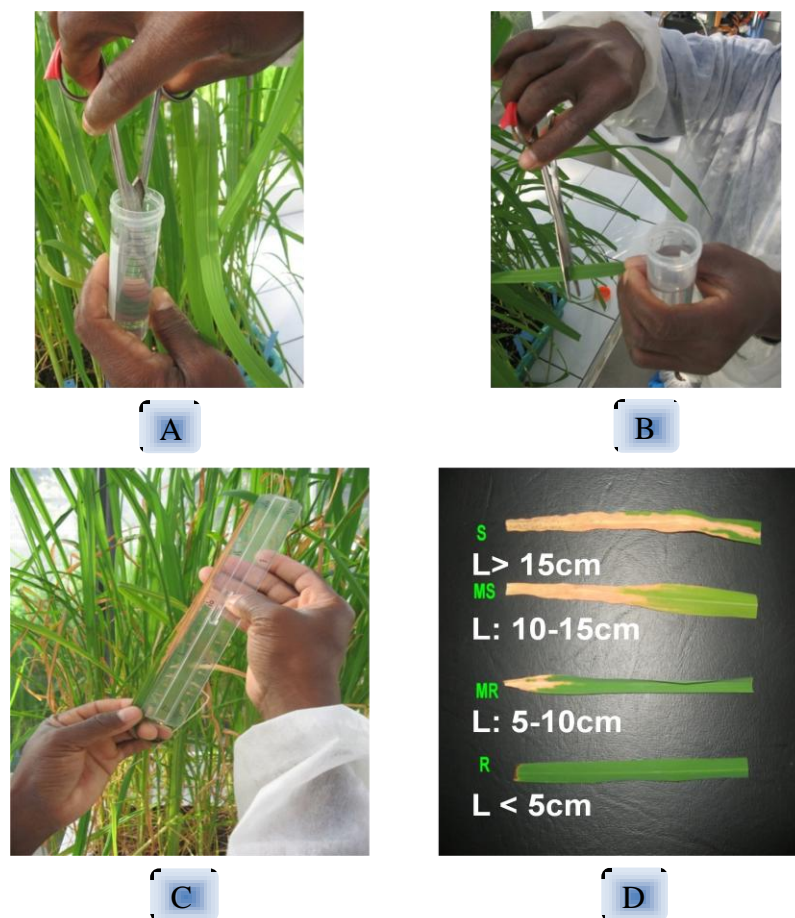


Figure II-2 : Inoculation par méthode de leaf-clipping (Kauffman *et al.*, 1973). A : Immersion d'une paire de ciseaux dans l'inoculum bactérien. B : Coupure de l'extrémité de deux jeunes feuilles de la plante. C : Mesure de la longueur de lésion (LL) de la feuille 21 jours après inoculation. D : Echelle de classification selon laquelle la plante est résistante si $LL < 5$ cm ; modérément résistante si $LL = 5$ à 10 cm ; modérément sensible si $LL = 10$ à 15 ; sensible si $LL > 15$ cm.

II-3 Dispositif expérimental et analyse de données

Deux essais d'évaluation de la maladie ont été effectués. Pour chaque essai, quatre lots constitués chacun des 115 accessions dont 107 *O. glaberrima* et 8 *O. sativa* ont été semés avec 10 graines par accession. Les 10 graines d'une accession sont semées en ligne dans une terrine contenant 8 accessions choisies au hasard. Les terrines sont disposées de façon aléatoire dans la serre. Chaque lot est inoculé par une souche de Xoo. Les deux jeunes feuilles entièrement ouvertes d'une plante sont

inoculées. Pour certaines accessions, le taux de germination est inférieur à 100%. Les individus non germés génèrent alors des données manquantes prises en compte dans l'analyse. Ainsi, pour chaque souche de *Xoo* testée, le pourcentage de données manquantes pour un total de 2300 données est de 1,3 ; 2,26 ; 4,43 et 2,43% respectivement pour les souches BAI3, BAI4, MAI1 et PXO86 dans le premier essai et 0,69 ; 1,04 ; 1,91 et 0,86% dans le deuxième essai.

Une analyse combinée des données des deux essais a été faite souche par souche suivant un modèle linéaire mixte en utilisant le package nlme du logiciel R V.2.7.2 (R Development Core Team 2008; Pinheiro *et al.*, 2009). Le modèle a été défini comme $y_{ijk} \approx \mu + \alpha_j + \beta_k + \varepsilon_{ijk}$ où y_{ijk} représente la longueur de lésion des feuilles de l'individu (i) de l'accession (j) dans l'essai (k) ; μ désigne l'intercept ; α_j l'effet de l'accession (j) ; β_k l'effet de l'essai (k) et ε_{ijk} le résiduel du modèle. L'accession est considérée comme effet fixe et l'essai, l'effet aléatoire. L'existence de différences significatives ($P < 0.001$) de longueurs de lésion entre accessions a été évaluée par le test F. La comparaison des accessions est basée sur la valeur du BLUE « *on best linear unbiased estimators* » de chaque accession (j) pour chaque souche, telle que $y'g = \mu + \alpha_j$ dans lequel μ est l'intercept et α_j est l'effet fixe de l'accession (j) (coefficient de l'effet fixe du modèle mixte).

II-4 Détection des allèles de résistance xa5 et Xa21

Douze variétés de riz *O. glaberrima* résistantes, moyennement résistantes, moyennement sensibles et sensibles à *Xoo* ont été sélectionnées et génotypées en vue de détecter les allèles de résistance xa5 et Xa21. Les lignées isogéniques IRBB5 et IRBB21 portant respectivement xa5 et Xa21 ont été utilisées comme témoins positifs alors qu'IR24 dépourvu de ces allèles a servi de témoin négatif. Les séquences des amorces utilisées pour amplifier les fragments d'ADN couvrant les régions SNP (single nucleotide polymorphism) de xa5 et Xa21 sont les suivantes:
xa5-6F: 5'GATAGCAGCATTTCCAAGAG3' ;
xa5-4R: 5'GATTCCTTTAGCAAGGTGTG3'
Xa21F: 5'ATAGCAACTGATTGCTTGG3'
Xa21R: 5'CGATCGGTATAACAGCAAAAAC3'

Pour la détection de xa5, l'ADN génomique a été extrait conformément au protocole décrit par Edwards *et al.* 1991. 10 ng d'ADN ont été utilisés dans un volume total de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de 15 μ l. Cette réaction PCR s'est déroulée en plusieurs phases à savoir une phase initiale de dénaturation à 94°C en 5min suivie de 33 cycles composés chacun d'une phase de dénaturation de 30 s à 94°C, une phase d'hybridation à 51°C pendant 30s et une phase d'extension de 72°C pendant 1min. La réaction se termine par une extension finale à 72°C pendant 5min. Les produits d'amplification sont digérés par une enzyme de restriction qui n'est rien d'autre qu'une endonucléase BsrI ou SmlI (Iyer *et*

McCouch, 2007). Les produits de digestion sont migrés, par électrophorèse, dans un gel d'agarose à 2,5%.

La détection de *Xa21* a été faite par la technique de « dot blot » (Shirasawa *et al.*, 2006). Les séquences d'ADN recouvrant les sites de polymorphisme simple nucléotide SNP ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces indiquées précédemment. Le programme PCR se présente comme suit : une phase initiale de dénaturation à 94°C pendant 4 min suivie de 34 cycles subdivisés chacun d'une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, une phase d'hybridation à 55°C pendant 1 min et une phase d'extension de 72°C pendant 2 min. La réaction se termine par une extension finale à 72°C pendant 8 min. Les produits PCR sont dilués au 1 :20, dénaturés dans une solution composée de NaOH 0,4N et de EDTA 10 mM, puis fixés à une membrane de nylon (Nytran; Schleicher & Schuell, Germany) grâce à UV-cross linker. Les Blots ont été préhybridés à 42°C avec du tampon d'hybridation (Roche DIG Easy Hyb) préchauffé pendant 30 min au moins. Les sondes (10 µM) préparées par resuspension de digoxigenin (DIG), sondes constituées d'oligo marqués, dans du Tris-EDTA pH8, ont été dénaturées à 68°C et immédiatement ajoutées au tampon d'hybridation préchauffé. Les blots ont été donc hybridés à 60°C pendant au moins 6h. Les filtres ont été lavés avec trois différentes solutions. Le premier lavage a été fait dans une solution de 2X SSC (1X SSC étant constitué de 0,15 M de NaCl plus 0,015 M de citrate de sodium) et 0,1% de sodium dodecyl sulfate (SDS) pendant 20 min suivi de deux lavages de 10 min chacun à l'aide d'une solution 1X SSC et SDS 0,1%. Les blots sont lavés une dernière fois avec 0,1X SSC et SDS 0,1% pendant 20 min. Les signaux sont détectés avec un kit de détection d'acides nucléiques DIG appelé NBT/BCIP (Roche, Switzerland).

III- Résultats

III-1 Identification de variétés d'*Oryza glaberrima* résistantes à la bactériose du riz

Les accessions de riz *Oryza glaberrima* ont réagit différemment aux souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* testées par la méthode de « leaf clipping » (Figure II-3; Tableau II-1). Les longueurs de lésion de feuille induites sont sensiblement différentes d'une souche *Xoo* à l'autre ($P < 0,0001$). Les différentes accessions résistantes aux souches africaines de *Xoo* proviennent de différentes zones géographiques (Tableau II-5). Parmi les vingt accessions d'*O. glaberrima* résistantes à la souche MA11 du Mali, quatre proviennent du Mali et les seize autres de la Côte d'Ivoire, de

la Guinée, du Libéria, du Nigéria, du Sénégal, de la Sierra Léone et du Zimbabwe. Il n'y a donc aucune corrélation entre le niveau de résistance et les origines géographiques des accessions de riz ni celles des souches *Xoo* testées (Tableau II-5).

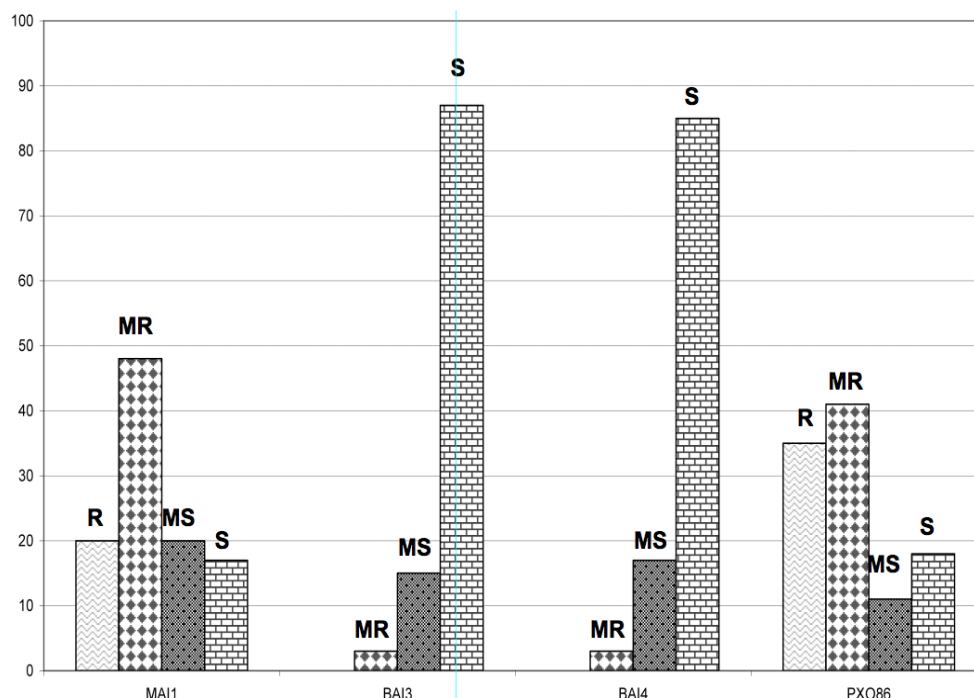


Figure II-3 : Différents types de réactions induites par les différentes souches MAI1, BAI3, BAI4 et PXO86 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* utilisées. R = résistant ; MR = modérément résistant ; MS = modérément sensible ; S = sensible

Vingt et trente six accessions montrent un niveau de résistance élevé respectivement aux souches africaines de *Xoo* MAI1 (race A3) et Asiatique PXO86 (Phil race 2) (Figure II-3; Tableau II-1). Parmi elles, dix sont résistantes aux deux souches MAI1 et PXO86 (Tableau II-2). Six accessions résistantes à MAI1 sont modérément résistantes à PXO86 (Tableau II-2). Inversement, dix sept parmi les cinquante et un accessions modérément résistantes à MAI1 montrent un niveau de résistance élevé à PXO86 (Tableau II-2). Seules deux et trois accessions sont modérément résistantes respectivement aux souches Burkinabè de *Xoo* BAI3 (race A1) et BAI4 (race A2) (Tableau II-2). Ces travaux ont aussi mis en évidence quinze accessions très sensibles à toutes les souches bactériennes d'origine africaine testées (Tableau II-2). Bien que les souches

bactériennes NAI8 (race A1) du Niger et CFBP1949 (race A3 du Mali) aient été testées sur un petit échantillon de dix accessions de *O. glaberrima*, les résultats confirment ceux obtenus avec les souches BAI3 (race A1) et MAI1 (race A3). Alors que des accessions résistantes et modérément résistantes à CFBP1949 ont été identifiées, aucune source de résistance élevée n'a été trouvée contre NAI8 (race A1) comme ce fut le cas de BAI3 (race A1). Alors que les huit accessions d'*O. sativa* criblées sont très sensibles à la souche bactérienne PXO86 d'origine asiatique, cinq d'entre elles sont très résistantes aux différentes souches bactériennes d'origine africaine (Tableau II-3). IR24 et ITA212 présentent des réactions variables en fonction des souches bactériennes utilisées. Azucena, par contre, est très sensible à toutes les souches bactériennes d'origine africaine utilisées dans cette étude.

III-2 Virulence des souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

La moyenne des longueurs de lésion (\pm erreur standard) induite sur les souches africaines de Xoo MAI1 (race A3), BAI3 (race A1), et BAI4 (race A2) sur les 107 accessions de *O. glaberrima* sont respectivement de $9,04 \pm 0,23$; $17.25 \pm 0,28$ et $18.21 \pm 0,28$ cm (Tableau II-1). Celles induites par CFBP1949 (race A3) et NAI8 (race A1) sont respectivement de 8 et 19 cm. Des différences de virulence ont été notées entre les souches Africaines de Xoo et celle d'Asie avec une moyenne allant de $2,33 \pm 0,12$ à $4,36 \pm 0,07$ (Tableau II-1).

Tableau II-1 : Caractéristiques des souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* utilisées et leurs réactions sur 107 accessions *O. glaberrima*

Souche	Origine	Race	Nombre des différentes réactions induites ^a				LL ^b			VL ^c		
			R	MR	MS	S	Min	Moy±SE ^d	Max	Min	Moy±SE	Max
Xoo BAI3	Burkina	A1	0	2	15	90	5.68	17.75±0.28	22.9	2	4.27±0.07	5
Xoo BAI4	Burkina	A2	0	3	17	87	6.15	18.21±0.28	31.4	2	4.36±0.07	5
Xoo MAI1	Mali	A3	20	51	20	16	0.93	9.04±0.23	24.18	1	2.54±0.10	5
Xoo PXO86	Philippines	Phil2	36	41	10	20	1.25	8.36±0.24	22.45	1	2.33±0.12	5

^a Résistant (R), Modérément résistant (MR), Modérément sensible (MS) et Sensible (S) ; ^b Longueur de lésion en centimètre ; ^c Virulence level (niveau de virulence) ; ^d Standar Error

Tableau II-3: Différentes réactions induites par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sur les accessions d'*Oryza sativa*.

Acc Name	Subspecies	Xoo strains used											
		BAI3 (race A1)			BAI4 (race A2)			MAI1 (race A3)			PXO86 (Phil race 2)		
		LL ¹ ± SE	T ²	VL ³	LL ± SE ⁴	T	VL	LL ± SE	T	VL	LL ± SE	T	VL
IR24	Indica	20.78 ± 0.28	S	5	21.00 ± 0.28	S	5	0.30 ± 0.24	R	1	15.33 ± 0.24	S	4
IR64	Indica	3.88 ± 0.28	R	1	0.98 ± 0.28	R	1	0.27 ± 0.24	R	1	17.33 ± 0.24	S	4
WAB165	Japonica	0.27 ± 0.24	R	1	3.20 ± 0.28	R	1	0.32 ± 0.24	R	1	17.08 ± 0.24	S	4
BG90-2	Indica	0.24 ± 0.28	R	1	0.38 ± 0.28	R	1	0.41 ± 0.24	R	1	19.58 ± 0.24	S	5
ITA212	Indica	7.10 ± 0.28	MR	2	7.28 ± 0.28	MR	2	2.73 ± 0.24	R	1	20.05 ± 0.24	S	5
ITA306	Indica	3.07 ± 0.29	R	1	2.73 ± 0.28	R	1	2.77 ± 0.24	R	1	20.43 ± 0.24	S	5
Kogoni	Indica	2.05 ± 0.28	R	1	2.32 ± 0.29	R	1	2.40 ± 0.24	R	1	20.13 ± 0.24	S	5
Azucena	Japonica	22.48 ± 0.23	S	5	22.48 ± 0.23	S	5	16.45 ± 0.17	S	4	25.58 ± 0.19	S	5

¹Moyennes (en cm) des longueurs de lésion (LL) induites par les différentes souches de Xoo et calculées avec $Pr > |t| < 0.0001$ à l'aide du logiciel R; ²Classification telle que décrite dans le texte et selon laquelle R: Résistant, MR: Modérément résistant, MS: Modérément sensible, S: sensible; ³Virulence Level (niveau de virulence) où 0, correspond à l'absence de symptôme; 1, LL comprise entre 1 et 3 cm; 2 lorsque LL varie de 4 to 7 cm; 3 avec LL entre 8 et 12 cm; 4 lorsque LL varie entre 13 et 18 cm; 5 avec LL > 19 cm (Vikal et al., 2007) ; ⁴Standard Error

Tableau II-2: Liste des accessions *O. glaberrima* résistantes et sensibles aux différentes souches de *X. oryzae* pv. *oryzae*

Reaction s ^a	African <i>Xoo</i> strains			Asian <i>Xoo</i> strain
	BAI3 (A1)	BAI4 (A2)	MAI1(A3)	PXO86 (Phil race 2)
R	-	-	CG14, TOG5284, TOG5314, TOG5437, TOG5439, TOG5453, TOG5803, TOG6195, TOG6710, TOG7020 TOG6202, TOG6206, TOG6238, TOG6356, TOG6767, RAM98, RAM69, RAM77, RAM94, TOG6308	IG02, TOG5293, TOG5406, TOG5447, TOG5458, TOG5464, TOG5473, TOG5491, TOG5514, TOG5523, TOG5533, TOG5566, TOG5591, TOG5602, TOG5620, TOG5650, TOG5675, TOG5810, TOG5882, TOG5953, TOG5989, TOG5997, TOG6000, TOG6007, TOG6231, TOG7173
MR	TOG5672, TOG6767	RAM63, RAM94, TOG5832	CG17, RAM24, RAM90, TOG5283, TOG5420, TOG5486, TOG5540, TOG5672, TOG5680, TOG5681, TOG5747, TOG5775, TOG5820, TOG5832, TOG6038, TOG6080, TOG6165, TOG6208, TOG6211 IG02, TOG5293, TOG5447, TOG5458, TOG5464, TOG5473, TOG5523, TOG5566, TOG5620, TOG5650, TOG5675, TOG5810, TOG5953, TOG5989, TOG6007, TOG6231, TOG7173, TOG5286, TOG5287, TOG5324, TOG5390, TOG5400, TOG5404, TOG5500, TOG5556, TOG5641, TOG6208, TOG6221, TOG7420, RAM63, RAM116, RAM123, MG12	TOG6202, TOG6206, TOG6238, TOG6356, TOG6767, RAM98, TOG5307, TOG5429, TOG5639, TOG5649, TOG5687, TOG5695, TOG5885, TOG5923, TOG5980, TOG6181, TOG6334, TOG7106, TOG7345, RAM55, RAM101, Saliforeh
S	RAM55, RAM112, TOG5307, TOG5639, TOG5649, TOG5666, TOG5687, TOG5885, TOG5997, TOG6334, TOG7106, TOG7345, Saliforeh, Dckono, PaDckono			RAM2, RAM59, RAM63, RAM77, RAM94, RAM95,

^a Réactions induites par les souches *Xoo* sur les accessions de *O. glaberrima*. En gras, sont les accessions résistantes à la souche africaine MAI1(RaceA3) et modérément résistantes à la souche asiatique PXO86 (Philrace2). Les accessions en gras et en italiques sont résistantes à la souche asiatique PXO86 (Phil race2) et modérément résistantes à la souche africaine MAI1 (RaceA3)

Les souches Africaines BAI3 et BAI4 du Burkina sont particulièrement virulentes sur toutes les accessions d'*O. glaberrima* criblées avec un niveau de virulence (VL) respectivement égal à 4,27 et 4,36 (Tableau II-1) et pouvant atteindre 5 contre IR24 et Azucena (Tableau II-3). Par contre, la souche Malienne MAI1 provoque de faibles symptômes sur *O. glaberrima* avec un VL égal à 2,54 (Figure II-2 ; Tableau II-1). Elle est aussi moins virulente sur la plupart des *O. sativa* criblés (VL = 1) excepté Azucena pour lequel son niveau de virulence est de 4 (Tableau II-3). Tout comme MAI1 du Mali, la souche asiatique PXO86 est moins virulente sur *O. glaberrima* (VL = 2,33) mais très virulente sur toutes les accessions d'*O. sativa* (Figure II-3, Tableau II-1 et II-3). MAI1 et PXO86 ont donc le même niveau de virulence sur *O. glaberrima*. Alors que la souche NAI8 (race A1) du Niger est très virulente, CFBP1949 d'origine malienne provoque de faibles symptômes sur les accessions d'*O. glaberrima*.

III-3 La détection des allèles de résistance *xa5* et *Xa21* chez

***Oryza glaberrima*.**

Les résultats du génotypage ont mis en évidence *xa5* et *Xa21* respectivement chez les lignées isogéniques IRBB5 et IRBB21. Ces allèles de résistance sont absents chez IR24 (Tableau II-4). Aucune des accessions d'*O. glaberrima* génotypées ne portent ces deux allèles. Toutefois, RAM95 est hétérozygote pour *xa5* (Tableau II-4).

Tableau II-4: Réaction d'un ensemble d'accessions d'*O. glaberrima* aux souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et leurs génotypes aux loci des marqueurs de *xa5* et *Xa21*.

Accession name	Origin	African <i>Xoo</i> strains				Asian <i>Xoo</i> strain	Genotypes of the accessions at loci <i>xa5</i> and <i>Xa21</i>				
		BAI3 (A1)	BAI4 (A2)	MAI1 (A3)	PXO86 (Phil race 2)	<i>xa5</i> (R)	<i>Xa5</i> (S)	<i>xa5</i> genotype	<i>Xa21</i> (R)	<i>xa21</i> (S)	<i>Xa21</i> genotype
TOG6208	Guinea	S ^a	S	MR	MR	- ^b	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
TOG6308	Liberia	S	S	R	S	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
RAM24	Mali	S	MS	MR	MR	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
RAM55	Mali	S	S	S	MR	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
RAM63	Mali	MS	MR	MR	S	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
RAM90	Mali	MS	S	MR	MR	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
RAM95	Mali	MS	S	MS	S	+	+	<i>xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
TOG5307	Nigeria	S	S	S	MR	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
TOG5500	Nigeria	S	S	MR	MS	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
TOG6211	Nigeria	S	S	MR	S	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
CG14	Senegal	MS	S	R	R	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
CG17	Senegal	S	S	MR	MR	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
IRBB5	Philippines	R	R	R	R	+	-	<i>xa5/xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>
IRBB21	Philippines	MS	MR	R	R	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	+	-	<i>Xa21/Xa21</i>
IR24	Philippines	S	S	R	MS	-	+	<i>Xa5/Xa5</i>	-	+	<i>xa21/xa21</i>

^a Types de réactions telles que définies dans le texte avec (R) résistant, (MR) modérément résistant, (MS) modérément sensible et (S) sensible

^b (+) Présence d'allèle; (-) absence d'allèle telles que détectées par Shirasawa et al (2006), IRRI (2007), et Iyer et McCouch (2007)

V- Discussion

Dans cette étude, un total de 107 accessions d'*O. glaberrima* fournies par la banque de gènes du centre du riz pour l'Afrique et originaires de 9 pays Africains à savoir la Côte d'Ivoire, le Ghana, la Guinée Conakry, le Libéria, le Mali, le Nigéria, le Sénégal, la Sierra-Léone et le Zimbabwe ont été évaluées pour leur résistance à la bactériose. Parmi elles, 20 et 36 sont résistantes respectivement aux souches Africaine MA11 (race A1) et Asiatique PXO86 (Phil race 2). Seules 5 accessions d'*O. glaberrima* sont moyennement résistantes aux souches bactériennes d'origine burkinabè. Les 20 accessions résistantes à la souche Malienne sont toutes sensibles aux souches Burkinabè et Nigériennes. Ces résultats suggèrent l'existence d'interactions complexes entre ces souches bactériennes et les gènes de résistance d'*O. glaberrima*. Il n'existe pas une corrélation claire entre le niveau de résistance des accessions de riz, leur origine géographique et celle des souches bactériennes. Les 20 accessions d'*O. glaberrima* résistantes à MA11 pourraient être utilisées dans des programmes d'amélioration de la résistance du riz à la bactériose au Mali. Les souches bactériennes originaires du Mali appartiennent exclusivement à la race A3. Cette race serait donc endémique au Mali (Gonzalez *et al.*, 2007) mais il est possible qu'elle soit également répandue dans les régions de l'Afrique de l'ouest qui n'ont pas encore été prospectées. Il est donc nécessaire de faire d'autres études en vue de déterminer la distribution géographique la plus complète possible de la race A3. Les résultats de cette étude montrent également que la souche de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO86 d'origine Asiatique est identique à MA11 d'origine Africaine en terme de virulence sur le riz cultivé Africain *Oryza glaberrima* bien que ces souches soient génétiquement distantes l'une de l'autre (Gonzalez *et al.*, 2007). En revanche, les différentes souches Africaines de *Xoo* présentent différents niveaux de virulence et induisent des types de réactions variés sur les accessions d'*O. glaberrima* bien qu'elles aient des domaines conservés de TALs (transcription activator like) effecteurs. Ces TALs sont connus pour jouer un rôle crucial dans l'interaction riz-*Xoo*. Les souches bactériennes des Philippines et du Mali sont moins virulentes sur *O. glaberrima* suggérant que ce dernier n'est pas leur hôte naturel. A l'opposé *Xoo* du Burkina et du Niger sont très virulentes sur *O. glaberrima* comme le témoignent les nombreuses accessions qui leur sont sensibles. Ceci s'expliquerait par une forte adaptation de ces souches à *O. glaberrima*. En se basant sur les réactions race-spécifiques des souches africaines de *Xoo* sur un sous-ensemble de lignées isogéniques dont IRBB4, IRBB5, IRBB7 et IRBB21 (Gonzalez *et al.*, 2007), on pourrait penser que les accessions de *O. glaberrima* résistantes et moyennement résistantes portent les gènes de résistance *Xa4*, *xa5*, *Xa7* et *Xa21*. Toutefois, les résultats de recherche allélique ont montré qu'aucune des accessions résistantes évaluées ne

porte les allèles *xa5* et *Xa21*. La seule accession résistante, RAM95, hétérozygote pour *xa5* est un intermédiaire entre *O. glaberrima* et *O. sativa* (A. Ghesquière, *communication personnelle*). Lorsqu'aucune accession d'*O. glaberrima* n'est résistante à BAI3 et BAI4 du Burkina, nous pourrions conclure que ces gènes de résistance précédemment cités ne sont pas impliqués dans la résistance de *O. glaberrima*. Parmi les accessions d'*O. sativa* évaluées, IR64 et Azucena, appartenant respectivement aux sous-espèces indica et japonica, présentent des niveaux de résistance très contrastés. Alors qu'IR64 est résistant à toutes les souches bactériennes africaines testées, Azucena leur est très sensible.

La population de cartographie de référence constituée de lignées recombinantes IR64 x Azucena (Boisnard *et al.*, 2007), pourrait donc être utilisée pour identifier des gènes de résistance spécifiques ou des QTLs de résistance aux souches Africaines de *Xoo*. Les gènes et QTLs impliqués dans la résistance chez *O. glaberrima* pourraient donc être cartographiés en utilisant des lignées interspécifiques *O. glaberrima* x *O. sativa*.

Parmi les 35 gènes de résistance identifiés contre les souches Asiatiques de *Xoo*, seuls 4 à savoir *Xa21* (Khush *et al.*, 1990), *Xa23* (Zhang *et al.*, 1998), *Xa27* (Gu *et al.*, 2004 ; 2005) et *Xa30 (t)* (Cheema *et al.*, 2008) proviennent respectivement de riz sauvages *O. longistaminata*, *O. rufipogon*, *O. minuta* et *O. nivara*. Il est donc nécessaire de porter un intérêt particulier à la recherche de nouvelles sources de résistance aux souches Africaines de *Xoo* chez les riz sauvages. Aussi intéressants que variés, les résultats de cette étude montrent également de nombreuses accessions d'*O. glaberrima* résistantes à PXO86. Ces accessions pourraient être utilisées dans des programmes d'amélioration génétique aussi bien aux Philippines que dans d'autres pays asiatiques. Les études de virulence et de profil génétique des *Xoo* aux Philippines, ont montré que la structure de la population bactérienne est très variable avec plus de 10 races (Leach *et al.*, 1992 ; Nelson *et al.*, 1994). De même, de nouvelles races très virulentes ont émergé et sont capables de contourner la résistance (Cruz *et al.*, 2000). Il est donc indispensable de poursuivre le criblage d'*O. glaberrima* avec d'autres souches bactériennes représentant les différentes races des Philippines bien que les souches de la race 2 telles que PXO86 soient très répandues dans les bas-fonds de ces îles.

La connaissance de la structure des populations bactériennes est nécessaire afin de prédire les gènes de résistance les plus efficaces. A cet effet, des efforts restent à faire pour prospecter de nombreuses autres régions d'Afrique afin d'accroître la collection de *Xoo*. Les accessions résistantes d'*O. glaberrima* identifiées dans cette étude seront criblées avec d'autres races de *Xoo* aussi bien en conditions contrôlées en serre que dans les milieux naturels. Les accessions confirmées résistantes en milieu naturel seront utilisées dans des croisements impliquant des accessions porteuses d'autres gènes d'intérêt agronomiques, ou directement déployées dans des programmes d'amélioration variétale dans des zones géographiques spécifiques.

Conclusion

Il ressort de ce chapitre, portant sur l'évaluation du riz cultivé africain *Oryza glaberrima* pour sa résistance à la bactériose vasculaire, que cette espèce de riz offre une résistance à la souche malienne MAI1 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, l'agent pathogène de la maladie. Cette résistance n'est gouvernée ni par xa5, ni par Xa21, deux gènes de résistance autrefois identifiés contre des souches asiatiques de *Xoo*. Par contre, toutes les accessions de riz criblées sont sensibles aux souches bactériennes du Burkina-Faso et du Niger. Le riz cultivé africain *Oryza glaberrima* présente donc une source de résistance étroite aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Contrairement à *O. glaberrima*, l'espèce de riz cultivé *Oryza sativa* d'origine asiatique constitue une véritable source de résistance à la bactériose, comme en témoigne ses six variétés résistantes notamment IR64 qui a montré un niveau de résistance élevé à toutes les souches africaines de *Xoo* testées. Au regard de tout ce qui précède, *Oryza sativa* sera donc utilisé, dans le prochain chapitre pour caractériser la résistance du riz aux souches africaines de *Xoo* à travers la cartographie de QTLs de résistance.

Tableau II-5: Données supplémentaires: Réactions provoquées par les souches de *Xoo* sur les accessions d'*Oryza glaberrima*

Xoo strains used														
Origin	Acc No ¹	Acc Name ²	BAI3		BAI4			MAI1			PXO86			
			LL ³ ± SE	T ⁴	VL ⁵	LL ± SE ⁶	T	VL	LL ± SE	T	VL	LL ± SE	T	VL
Ghana	Na	TOG5591	20.53 ± 0.28	S	5	19.43 ± 0.28	S	5	13.23 ± 0.24	MS	4	2.18 ± 0.24	R	1
Ghana	IRGC86764	TOG5620	10.78 ± 0.28	MS	3	12.63 ± 0.28	MS	3	5.66 ± 0.24	MR	2	3.99 ± 0.25	R	1
Ghana	IRGC 86762	TOG5602	19.00 ± 0.28	S	4	20.08 ± 0.28	S	5	12.65 ± 0.24	MS	3	2.03 ± 0.24	R	1
Guinea	IRGC86805	TOG6202	15.75 ± 0.28	S	4	14.30 ± 0.28	MS	4	4.11 ± 0.24	R	2	7.21 ± 0.25	MR	2
Guinea	IRGC 96837	TOG6195	16.04 ± 0.28	S	4	13.03 ± 0.29	MS	4	4.79 ± 0.24	R	2	2.69 ± 0.25	R	1
Guinea	IRGC 96842	TOG6208	16.73 ± 0.28	S	4	19.00 ± 0.28	S	4	7.43 ± 0.24	MR	2	8.50 ± 0.24	MR	3
Ivory Coast	IRGC96720	TOG5283	17.60 ± 0.28	S	4	16.90 ± 0.28	S	4	6.95 ± 0.24	MR	2	6.71 ± 0.25	MR	2
Ivory Coast	Na	IG02	18.85 ± 0.28	S	4	18.10 ± 0.28	S	4	6.80 ± 0.24	MR	2	3.50 ± 0.24	R	1
Ivory Coast	IB91	TOG5282	20.18 ± 0.28	S	5	20.78 ± 0.28	S	5	10.78 ± 0.24	MS	3	12.70 ± 0.24	MS	3
Ivory Coast	IRGC 96721	TOG5284	15.20 ± 0.28	S	4	13.11 ± 0.29	MS	4	2.15 ± 0.24	R	1	3.27 ± 0.25	R	1
Liberia	IRGC86784	TOG5810	18.20 ± 0.28	S	4	17.93 ± 0.28	S	4	5.50 ± 0.24	MR	2	3.63 ± 0.25	R	1
Liberia	IRGC112565	TOG5747	19.23 ± 0.28	S	5	20.70 ± 0.28	S	5	7.45 ± 0.24	MR	2	6.90 ± 0.24	MR	2
Liberia	IRGC 86779	TOG5775	19.96 ± 0.29	S	5	18.73 ± 0.28	S	4	7.55 ± 0.24	MR	2	6.90 ± 0.24	MR	2
Liberia	IRGC 96802	TOG5803	19.30 ± 0.28	S	5	19.89 ± 0.29	S	5	1.49 ± 0.24	R	1	1.93 ± 0.24	R	1
Liberia	IRGC 96804	TOG5820	19.13 ± 0.28	S	5	18.66 ± 0.29	S	4	6.00 ± 0.24	MR	2	6.78 ± 0.24	MR	2
Liberia	IRGC 96806	TOG5832	19.50 ± 0.28	S	5	8.73 ± 0.28	MR	3	5.50 ± 0.24	MR	2	7.20 ± 0.24	MR	2
Liberia	IRGC 96809	TOG5882	17.25 ± 0.28	S	4	19.18 ± 0.28	S	5	10.95 ± 0.24	MS	3	3.83 ± 0.24	R	1
Liberia	IRGC112568	TOG5885	19.45 ± 0.28	S	5	19.80 ± 0.28	S	5	18.30 ± 0.24	S	4	6.80 ± 0.24	MR	2
Liberia	IRGC 86791	TOG5923	19.23 ± 0.28	S	5	19.68 ± 0.28	S	5	12.95 ± 0.24	MS	3	6.50 ± 0.24	MR	2
Liberia	IRGC 86812	TOG6238	20.45 ± 0.28	S	5	16.73 ± 0.28	S	4	3.50 ± 0.24	R	1	7.65 ± 0.24	MR	2
Liberia	IRGC102265	TOG6308	18.49 ± 0.29	S	4	18.03 ± 0.28	S	4	4.53 ± 0.24	R	2	18.33 ± 0.24	S	4

Xoo strains used

Origin	Acc No ¹	Acc Name ²	BAI3		BAI4			MAI1			PXO86			
			LL ³ ± SE	T ⁴	VL ⁵	LL ± SE ⁶	T	VL	LL ± SE	T	VL	LL ± SE	T	VL
Liberia	IRGC102289	TOG6334	20.20 ± 0.28	S	5	16.90 ± 0.28	S	4	16.68 ± 0.24	S	4	8.00 ± 0.24	MR	3
Liberia	IRGC102309	TOG6356	11.88 ± 0.28	MS	3	18.28 ± 0.28	S	4	0.93 ± 0.24	R	1	6.40 ± 0.24	MR	2
Liberia	IRGC102613	TOG6710	19.41 ± 0.28	S	5	19.55 ± 0.28	S	5	2.26 ± 0.24	R	1	2.23 ± 0.24	R	1
Liberia	IRGC102694	TOG6767	6.55 ± 0.28	MR	2	18.98 ± 0.28	S	4	1.78 ± 0.24	R	1	7.33 ± 0.24	MR	2
Mali	Na	TOG7106	18.33 ± 0.28	S	4	18.83 ± 0.29	S	4	18.93 ± 0.24	S	4	6.20 ± 0.24	MR	2
Mali	IRGC103544	MG12	18.00 ± 0.28	S	4	20.93 ± 0.28	S	5	9.58 ± 0.24	MR	3	13.03 ± 0.24	MS	4
Mali	Na	RAM101	18.98 ± 0.28	S	4	18.73 ± 0.28	S	4	12.86 ± 0.24	MS	3	7.55 ± 0.24	MR	2
Mali	Na	RAM112	21.03 ± 0.28	S	5	20.18 ± 0.28	S	5	21.25 ± 0.24	S	5	20.90 ± 0.24	S	5
Mali	Na	RAM116	20.84 ± 0.29	S	5	20.53 ± 0.28	S	5	7.37 ± 0.24	MR	2	20.60 ± 0.24	S	5
Mali	Na	RAM123	20.55 ± 0.28	S	5	20.48 ± 0.28	S	5	7.35 ± 0.26	MR	2	17.00 ± 0.24	S	4
Mali	Na	RAM2	19.75 ± 0.28	S	5	19.20 ± 0.28	S	5	12.36 ± 0.25	MS	3	20.30 ± 0.24	S	5
Mali	Na	RAM24	17.63 ± 0.28	S	4	12.25 ± 0.28	MS	3	5.74 ± 0.24	MR	2	8.08 ± 0.24	MR	3
Mali	Na	RAM55	17.00 ± 0.28	S	4	18.50 ± 0.28	S	4	16.60 ± 0.24	S	4	8.16 ± 0.25	MR	3
Mali	Na	RAM59	21.20 ± 0.28	S	5	19.35 ± 0.28	S	5	12.97 ± 0.25	MS	3	18.64 ± 0.24	S	4
Mali	Na	RAM63	12.18 ± 0.28	MS	3	6.15 ± 0.28	MR	2	5.70 ± 0.24	MR	2	16.13 ± 0.24	S	4
Mali	Na	RAM69	20.18 ± 0.28	S	5	19.58 ± 0.29	S	5	3.53 ± 0.24	R	1	12.65 ± 0.24	MS	3
Mali	Na	RAM77	18.70 ± 0.28	S	4	19.80 ± 0.28	S	5	3.10 ± 0.24	R	1	18.23 ± 0.24	S	4
Mali	Na	RAM90	13.20 ± 0.28	MS	4	15.60 ± 0.28	S	4	9.11 ± 0.24	MR	3	8.83 ± 0.24	MR	3
Mali	Na	RAM94	19.68 ± 0.28	S	5	7.03 ± 0.28	MR	2	3.23 ± 0.24	R	1	19.40 ± 0.24	S	5
Mali	Na	RAM95	12.08 ± 0.28	MS	3	18.78 ± 0.28	S	4	12.10 ± 0.24	MS	3	19.03 ± 0.24	S	5
Mali	Na	RAM98	20.03 ± 0.28	S	5	19.48 ± 0.28	S	5	3.37 ± 0.24	R	1	7.28 ± 0.24	MR	2
Mali	IRGC 96854	TOG6231	21.03 ± 0.28	S	5	17.68 ± 0.28	S	4	6.83 ± 0.24	MR	2	2.80 ± 0.25	R	1
Nigeria	IRGC 96744	TOG5420	20.48 ± 0.28	S	5	17.11 ± 0.29	S	4	8.25 ± 0.24	MR	3	6.85 ± 0.25	MR	2
Nigeria	IRGC86745	TOG5437	18.73 ± 0.28	S	4	16.98 ± 0.28	S	4	4.15 ± 0.24	R	2	2.58 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC96752	TOG5439	18.60 ± 0.28	S	4	17.45 ± 0.28	S	4	2.63 ± 0.24	R	1	2.93 ± 0.24	R	1

Origin	Acc No ¹	Acc Name ²	BAI3		BAI4			MAI1			PX086			
			LL ³ ± SE	T ⁴	VL ⁵	LL ± SE ^b	T	VL	LL ± SE	T	VL	LL ± SE	T	VL
Nigeria	IRGC86747	TOG5453	19.75 ± 0.28	S	5	19.08 ± 0.28	S	5	2.63 ± 0.24	R	1	3.00 ± 0.24	R	1
Nigeria	Na	TOG5458	18.15 ± 0.28	S	4	18.40 ± 0.28	S	4	7.08 ± 0.24	MR	2	3.03 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC86769	TOG5649	20.63 ± 0.28	S	5	19.15 ± 0.28	S	5	19.05 ± 0.24	S	5	7.80 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC96788	TOG5666	20.95 ± 0.28	S	5	22.40 ± 0.28	S	5	19.40 ± 0.24	S	5	10.68 ± 0.24	MS	3
Nigeria	Na	TOG5672	5.68 ± 0.28	MR	2	14.73 ± 0.28	MS	4	7.05 ± 0.24	MR	2	8.25 ± 0.24	MR	3
Nigeria	IRGC86774	TOG5687	18.55 ± 0.29	S	4	19.23 ± 0.28	S	5	19.40 ± 0.24	S	5	7.45 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC96822	TOG6000	19.75 ± 0.28	S	5	19.35 ± 0.28	S	5	12.78 ± 0.24	MS	3	1.25 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC86802	TOG6181	19.21 ± 0.29	S	5	25.58 ± 0.28	S	5	13.06 ± 0.24	MS	4	7.33 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC96849	TOG6221	19.25 ± 0.28	S	5	20.20 ± 0.28	S	5	9.15 ± 0.24	MR	3	19.93 ± 0.24	S	5
Nigeria	IRGC 96722	TOG5286	18.28 ± 0.28	S	4	19.23 ± 0.28	S	5	7.56 ± 0.25	MR	2	15.29 ± 0.24	S	4
Nigeria	IRGC 96723	TOG5287	19.6 ± 0.28	S	5	20.00 ± 0.28	S	5	7.50 ± 0.24	MR	2	19.85 ± 0.24	S	5
Nigeria	IRGC 96725	TOG5293	17.48 ± 0.28	S	4	11.93 ± 0.28	MS	3	5.86 ± 0.24	MR	2	2.88 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 96726	TOG5307	17.39 ± 0.28	S	4	30.43 ± 0.28	S	5	15.75 ± 0.24	S	4	10.80 ± 0.24	MR	3
Nigeria	IRGC 96728	TOG5314	12.83 ± 0.28	MS	3	19.20 ± 0.28	S	5	3.10 ± 0.24	R	1	3.00 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 96732	TOG5324	17.4 ± 0.28	S	4	19.28 ± 0.28	S	5	7.63 ± 0.25	MR	2	19.33 ± 0.24	S	5
Nigeria	IRGC 86742	TOG5326	20.6 ± 0.28	S	5	19.43 ± 0.28	S	5	11.28 ± 0.24	MS	3	18.63 ± 0.24	S	4
Nigeria	IRGC 86743	TOG5378	19 ± 0.28	S	4	18.76 ± 0.29	S	4	11.49 ± 0.26	MS	3	11.85 ± 0.24	MS	3
Nigeria	IRGC 96740	TOG5390	18.6 ± 0.28	S	4	10.23 ± 0.28	MS	3	6.63 ± 0.25	MR	2	12.70 ± 0.24	MS	3
Nigeria	IRGC 96741	TOG5400	19.3 ± 0.28	S	5	18.93 ± 0.28	S	4	7.45 ± 0.24	MR	2	18.45 ± 0.24	S	4
Nigeria	IRGC 96742	TOG5404	19.7 ± 0.28	S	5	23.13 ± 0.28	S	5	7.73 ± 0.24	MR	2	22.45 ± 0.24	S	5
Nigeria	IRGC112571	TOG5406	17.56 ± 0.28	S	4	18.03 ± 0.28	S	4	11.58 ± 0.24	MS	3	2.83 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC112564	TOG5429	19.13 ± 0.29	S	5	12.8 0 ± 0.29	MS	3	13.08 ± 0.24	MS	4	6.19 ± 0.25	MR	2
Nigeria	IRGC 96756	TOG5447	11.99 ± 0.29	MS	3	20.08 ± 0.28	S	5	5.78 ± 0.24	MR	2	3.03 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 96760	TOG5464	18.8 ± 0.28	S	4	19.25 ± 0.28	S	5	6.15 ± 0.24	MR	2	2.35 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 104534	TOG5473	12.63 ± 0.28	MS	3	11.78 ± 0.28	MS	3	5.47 ± 0.24	MR	2	2.90 ± 0.24	R	1

Origin	Acc No ¹	BAI3		BAI4		MAI1		PXO86						
		Acc Name ²	LL ³ ± SE	T ⁴	VL ⁵	LL ± SE ⁶	T	VL	LL ± SE	T	VL	LL ± SE	T	VL
Nigeria	IRGC 86752	TOG5486	11.75 ± 0.28	MS	3	21.75 ± 0.28	S	5	6.59 ± 0.26	MR	2	6.55 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC 96766	TOG5491	18.78 ± 0.28	S	4	18.38 ± 0.28	S	4	12.20 ± 0.24	MS	3	1.96 ± 0.24	R	1
Nigeria	Na	TOG5500	16.58 ± 0.28	S	4	20.45 ± 0.28	S	5	6.38 ± 0.24	MR	2	10.90 ± 0.24	MS	3
Nigeria	Na	TOG5514	18.78 ± 0.28	S	4	18.55 ± 0.28	S	4	12.10 ± 0.24	MS	3	2.20 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 86757	TOG5523	19.13 ± 0.28	S	5	12.68 ± 0.28	MS	3	6.73 ± 0.24	MR	2	1.85 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC103929	TOG5533	12.43 ± 0.28	MS	3	18.26 ± 0.3	S	4	18.48 ± 0.24	S	4	1.36 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 86759	TOG5540	15.28 ± 0.28	S	4	19.71 ± 0.29	S	5	6.55 ± 0.24	MR	2	6.50 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC 96778	TOG5556	19.45 ± 0.28	S	5	23.28 ± 0.28	S	5	8.15 ± 0.24	MR	3	19.35 ± 0.24	S	5
Nigeria	IRGC 96779	TOG5566	18.79 ± 0.29	S	4	19.90 ± 0.29	S	5	5.98 ± 0.24	MR	2	2.60 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 86766	TOG5639	18.9 ± 0.28	S	4	19.55 ± 0.28	S	5	19.40 ± 0.24	S	5	7.20 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC 96786	TOG5641	20.2 ± 0.28	S	5	13.40 ± 0.28	MS	4	8.18 ± 0.24	MR	3	12.60 ± 0.24	MS	3
Nigeria	IRGC104543	TOG5650	20.28 ± 0.28	S	5	18.83 ± 0.28	S	4	7.75 ± 0.24	MR	2	1.80 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 96791	TOG5675	10.18 ± 0.28	MS	3	14.38 ± 0.28	MS	4	9.50 ± 0.24	MR	3	3.60 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 86772	TOG5680	19.64 ± 0.28	S	5	15.25 ± 0.28	S	4	6.41 ± 0.24	MR	2	8.55 ± 0.25	MR	3
Nigeria	IRGC 96793	TOG5681	12.15 ± 0.28	MS	3	15.63 ± 0.29	S	4	8.26 ± 0.24	MR	3	7.97 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC 86775	TOG5691	13.1 ± 0.28	MS	4	18.70 ± 0.28	S	4	11.99 ± 0.24	MS	3	12.48 ± 0.24	MS	3
Nigeria	Na	TOG5695	11.45 ± 0.29	MS	3	19.76 ± 0.29	S	5	14.38 ± 0.24	MS	4	6.85 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC 96811	TOG5953	19.76 ± 0.29	S	5	19.28 ± 0.28	S	5	6.38 ± 0.24	MR	2	2.28 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 96816	TOG5980	16.89 ± 0.28	S	4	20.00 ± 0.29	S	5	12.18 ± 0.24	MS	3	8.55 ± 0.24	MR	3
Nigeria	Na	TOG5989	19.8 ± 0.28	S	5	19.67 ± 0.29	S	5	6.50 ± 0.24	MR	2	2.28 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 86797	TOG5997	19.53 ± 0.28	S	5	19.08 ± 0.28	S	5	19.08 ± 0.24	S	5	2.15 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 96824	TOG6007	19.4 ± 0.28	S	5	19.10 ± 0.28	S	5	6.33 ± 0.24	MR	2	1.55 ± 0.24	R	1
Nigeria	IRGC 96829	TOG6038	20.1 ± 0.29	S	5	12.38 ± 0.28	MS	3	6.78 ± 0.24	MR	2	6.73 ± 0.24	MR	2

Origin	Acc No ¹	Acc Name ²	BAI3		BAI4		MAI1		PXO86					
			LL ³ ± SE	T ⁴	VL ⁵	LL ± SE ⁶	T	VL	LL ± SE	T	VL	LL ± SE	T	VL
Nigeria	IRGC 96832	TOG6080	17.86 ± 0.28	S	4	13.25 ± 0.29	MS	4	7.31 ± 0.24	MR	2	6.69 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC112575	TOG6165	20.76 ± 0.29	S	5	17.68 ± 0.28	S	4	7.73 ± 0.24	MR	2	6.19 ± 0.25	MR	2
Nigeria	IRGC 96844	TOG6211	17.83 ± 0.28	S	4	20.15 ± 0.28	S	5	6.68 ± 0.24	MR	2	6.05 ± 0.24	MR	2
Nigeria	IRGC112599	TOG7345	18.48 ± 0.28	S	4	18.36 ± 0.29	S	4	19.53 ± 0.24	S	5	7.63 ± 0.24	MR	2
Senegal	IRGC 96717	CG14	11.58 ± 0.28	MS	3	17.71 ± 0.29	S	4	4.31 ± 0.24	R	2	3.25 ± 0.24	R	1
Senegal	IRGC 86741	CG17	18.48 ± 0.28	S	4	20.50 ± 0.28	S	5	6.03 ± 0.24	MR	2	5.50 ± 0.24	MR	2
Senegal	IRGC 96893	TOG7173	15.9 ± 0.28	S	4	13.55 ± 0.28	MS	4	7.00 ± 0.24	MR	2	3.60 ± 0.24	R	1
Sierra Leone	Na	DcKono	22.55 ± 0.28	S	5	23.36 ± 0.29	S	5	24.18 ± 0.24	S	5	19.23 ± 0.24	S	5
Sierra Leone	Na	PaDcKono	17.5 ± 0.28	S	4	26.58 ± 0.29	S	5	19.20 ± 0.24	S	5	17.44 ± 0.24	S	4
Sierra Leone	Na	Saliforeh	18.18 ± 0.28	S	4	31.40 ± 0.28	S	5	17.05 ± 0.24	S	4	8.50 ± 0.24	MR	3
Sierra Leone	IRGC 96888	TOG7020	16.99 ± 0.29	S	4	13.08 ± 0.29	MS	4	3.41 ± 0.24	R	1	2.85 ± 0.24	R	1
Sierra Leone	IRGC 112607	TOG7420	22.9 ± 0.28	S	5	24.25 ± 0.28	S	5	6.23 ± 0.24	MR	2	12.03 ± 0.24	MS	3
Zimbabwe	IRGC 96841	TOG6206	18.33 ± 0.28	S	4	16.80 ± 0.28	S	4	2.19 ± 0.24	R	1	6.29 ± 0.25	MR	2

¹ Numéro d'accension selon la base de données de l'IRRI (Manila, Philippines), na: not available (non disponible); ² Nom d'accension donné par AfricaRice (Cotonou, Benin); ³ Moyenne (en cm) de longueur de lésion induite par les différentes souches de Xoo et calculée avec $Pr > |t| < .0001$ à l'aide du logiciel R; ⁴ Différents types de réactions avec R: Résistant, MR: Modérément résistant, MS: Modérément sensible, S: sensible ⁵ Virulence Level (Niveau de virulence) tel que décrit par Vikal et al. (2007); ⁶ Standard Error

Chapitre III

Identification et cartographie de QTLs de résistance spécifiques aux souches africaines de *Xantomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Résumé

Les bases génétiques de la résistance du riz aux souches Africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), l'agent pathogène de la bactériose vasculaire du riz, n'ont jamais été étudiées. Dans ce chapitre, des QTLs de résistance aux souches Africaines de *Xoo* ont été cartographiés dans la population de référence constituée de lignées recombinantes issues du croisement entre la variété de riz IR64 (*Oryza sativa* sous-espèce *indica*) et Azucena (*Oryza sativa* sous-espèce *japonica*). Pour cette étude, la carte génétique de référence de la même population, saturée avec 226 marqueurs microsatellites, régulièrement répartis dans tout le génome, a été utilisée. Le phénotypage de la population pour sa ségrégation pour la maladie a été conduit en conditions contrôlées en serre à l'Institut de Recherche pour le Développement IRD de Montpellier/France par inoculation de plantules âgées de six semaines par la méthode de « leaf clipping ». Quatre souches africaines de *Xoo* ont été utilisées pour le criblage de la population. Ce sont BAI3 et NAI8 appartenant à la race A1 et originaires respectivement du Burkina et du Niger ; BAI4 de la race A2 provenant du Burkina; et MAI1 originaire du Mali et appartenant à la race A3. Les souches asiatiques PXO61 (Phil race 1) et PXO86 (Phil race 2), originaires des Philippines ont été également utilisées. Les analyses de QTL ont été faites avec les logiciels de cartographie MapDisto, WinQTLCartographer 2.5 et Qgene-4. Quatre des cinq QTLs induits par les souches Africaines de *Xoo* sont différents de ceux induits par les souches asiatiques. Les gènes et QTLs de résistance autrefois identifiés contre les souches Asiatiques de *Xoo* ont été répertoriés et recartographiés sur la même carte IR64 x Azucena. Certains de ces gènes et QTLs se sont révélés communs à des souches Africaines et Asiatiques. D'autres, par contre, sont spécifiques aux souches Africaines et pourront être utilisés dans des programmes d'amélioration variétale en Afrique, une fois leur cartographie fine achevée.

I- Introduction

La résistance contre la bactériose vasculaire a été particulièrement étudiée chez le riz asiatique *Oryza sativa*. En Asie, de nombreux travaux ont été effectués notamment sur la structure et la distribution géographique des populations bactériennes, les mécanismes d'interaction riz-*Xanthomonas* et les bases génétiques de la résistance du riz à l'agent pathogène. Le moyen le plus efficace pour le contrôle de la bactériose reste le déploiement, dans la riziculture, de variétés résistantes. La création de ces variétés résistantes par sélection assistée par marqueurs nécessite d'abord l'identification et la cartographie de gènes de résistance. Ainsi, 35 gènes de résistance aux souches asiatiques de *Xoo* et 17 QTLs ont été identifiés dans des variétés cultivées de riz asiatiques et des types sauvages. Plusieurs de ces gènes induisent des résistances race-spécifiques et ont été introgressés dans des variétés élites d'Asie par la sélection assistée par marqueurs (Kinoshita, 1995; Lin *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Khush et Angeles 1999; Gao *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2004). Dans le précédent chapitre, nous avons montré que le riz africain *Oryza glaberrima* constitue une base génétique très étroite pour la résistance à la bactériose (Djedatin *et al.*, 2011). Les bases génétiques de la résistance du riz aux souches Africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), l'agent pathogène de la bactériose vasculaire du riz, n'ont jamais été étudiées. En outre, le génome du riz *Oryza sativa* ayant été entièrement séquencé, il est important d'avoir une vue d'ensemble sur les gènes de résistance au BB, et de connaître leur positions exactes dans le génome. Les objectifs de ce travail sont :

- Identifier et analyser la base génétique de la résistance du riz asiatique *O. sativa* aux souches Africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* par une approche d'analyse QTL en utilisant la population de référence constituée de lignées recombinantes obtenues par croisement de la variété résistante IR64 (*O. sativa* subsp. *indica*), par la variété sensible Azucena (*O. sativa* subsp. *japonica*).

- Répertoire tous les gènes et QTLs de résistance déjà identifiés contre les souches Asiatiques de *Xoo* et les recartographier sur la même carte IR64 x Azucena en vu de mettre en évidence ceux qui sont communs aux souches *Xoo* d'Afrique et d'Asie et ceux qui leur sont spécifiques afin de savoir lesquels pourraient être déployés dans la riziculture africaine.

II-Matériels et méthodes.

II-1 Identification et cartographie de QTLs de résistance aux souches Africaines de Xoo

II-1-1 Population de cartographie.

La population de référence constituée de 178 lignées recombinantes obtenues par croisement de la variété résistante IR64 (*O. sativa* subsp. *indica*), par la variété sensible Azucena (*O. sativa* subsp. *japonica*) a été utilisée. IR64 est une variété élite améliorée qui est très cultivée en Asie tropicale. Elle porte le gène de résistance *Xa4* qui a un large spectre d'action sur les souches bactériennes. La variété traditionnelle Azucena sensible à la bactériose est tolérante aux stress abiotiques tels que la sécheresse. Cette population a servi déjà dans plusieurs études génétiques notamment de cartographie de gènes et QTLs de résistance à la sécheresse, à la toxicité ferreuse, au virus de la panachure jaune du riz.

II-1-2 Ségrégation de la population de cartographie pour la résistance à la bactériose

Quatre souches africaines et deux souches Asiatiques de Xoo ont été utilisées pour le criblage phénotypique de la population de cartographie. Il s'agit, pour les souches Africaines, de BAI3 et BAI4 du Burkina appartenant respectivement à la race A1 et la race A2, NAI8 (race A1) du Niger, et la souche MAI1 de la race A3 provenant du Mali. Les souches asiatiques utilisées sont PXO61 et PXO86 appartenant à la race 2 de Philippines. La préparation de l'inoculum bactérien, l'inoculation, la prise et le traitement des données phénotypiques ont été faits comme précédemment décrit dans le chapitre 2. Dix individus par lignée ont été criblés.

II-1-3 Génotypage de la population de cartographie

Deux centimètres de feuilles de riz sont récoltés par plante et broyés dans de l'azote liquide. L'ADN est extrait suivant le protocole d'Edwards et al (1991). Les différentes PCR ont été faites suivant le programme précédemment décrit dans le chapitre 2. L'électrophorèse des produits PCR a été faite sur gel d'agarose à 2% ou sur du polyacrylamide à 6% par le système électrophorétique LICOR.

II-1-4 Méthodes d'analyse QTLs

La carte génétique de 226 marqueurs microsatellites construite à partir de la population de lignées recombinantes IR64 x Azucena a été utilisée. Dans un premier temps, une analyse de variance a été faite à l'aide du logiciel MapDisto afin d'avoir une vue générale sur les positions putatives des QTLs. Cette analyse consiste à comparer les moyennes phénotypiques des deux classes d'individus pour chaque marqueur (génotype AA et génotype aa). Si les moyennes sont significativement différentes, alors un QTL en ségrégation se trouve au voisinage du marqueur considéré. Vu le nombre important d'analyses effectuées qui est de 226 (équivalant au nombre de marqueurs de la carte IR64 x Azucena), nous avons retenu les QTLs à un seuil sévère $p < 0,001$ afin d'éviter des faux positifs. Ensuite la méthode de cartographie par intervalle a été utilisée pour l'identification des QTLs et leurs intervalles de confiance. Les QTLs ont été retenus au seuil LOD > 3 . Le LOD score est le logarithme décimal du rapport des vraisemblances de deux hypothèses: présence et absence de QTL. Dans la présente analyse, un QTL n'est alors retenu que lorsque la probabilité de sa présence est plus de mille fois supérieure à celle de son absence. Cette analyse a été faite à l'aide des logiciels Windows QTL Cartographer 2.5 et Qgene V-4.

II-2- Interpolation des gènes et QTLs de résistance aux souches Asiatiques de Xoo sur la carte génétique IR64 x Azucena.

Les QTLs cartographiés dans cette étude et tous les gènes et QTLs de résistance autrefois identifiés contre les souches Asiatiques de Xoo ont été répertoriés de même que les différentes populations de cartographie, leurs parents donneurs, leurs positions génétiques sur différentes cartes génétiques et leurs positions physiques. En utilisant les marqueurs co-localisants et/ou marqueurs flanquants, la position génétique de chaque gène ou QTL a été interpolée de la carte originelle sur la carte Nipponbare. La position physique des gènes finement cartographiés a été directement reportée sur cette carte.

III- Résultats

III-1 La ségrégation de la population IR64 x Azucena pour la résistance à la bactériose.

La moyenne des longueurs de lésion provoquée par les souches bactériennes sur les parents de croisement IR64 et Azucena sont respectivement de $0,25 \pm 0,1$ et $16,1 \pm 2$ cm avec la souche MA11 ; $0,76 \pm 0,2$ et $22,36 \pm 2,7$ cm avec BAI4 ; $4,07 \pm 1$ et $22,29 \pm 3$ cm avec BAI3 ; $2,07$

$\pm 0,5$ et $26,29 \pm 3,3$ cm avec NAI8. IR64 est donc résistante à toutes les souches bactériennes d'origine Africaine utilisées alors qu'Azucena leur est sensible. L'analyse de la ségrégation de la population de cartographie pour la maladie montre que les longueurs de lésion provoquées sur les descendants varient largement de 0,12 cm à 30,05 cm ; de 0,14 à 32,2 cm ; de 0,2 à 32,6 cm et de 0,44 à 37,9 cm respectivement avec MAI1, BAI4, BAI3 et NAI8. Cette variation continue des longueurs de lésion indique que la résistance est gouvernée par des QTLs. Contrairement aux souches Africaines de Xoo, la souche Asiatique PXO86 est virulente aussi bien sur Azucena que sur IR64 provoquant des longueurs de lésion de $16,46 \pm 1,5$ et 26 ± 3 cm respectivement sur IR64 et Azucena. La deuxième souche Asiatique PXO61 est avirulente sur IR64 induisant une longueur de lésion de $1,92 \pm 0,4$ cm tandis qu'Azucena, de longueur de lésion $28,32 \pm 3,1$ cm, lui est sensible. Les longueurs de lésion des lignées présentent une variation continue allant de 6,95 à 34,5 cm et de 0,5 à 30,8 cm respectivement avec PXO86 et PXO61. Ainsi donc, la résistance contre les souches Asiatiques est aussi gouvernée par des QTLs.

III-2 Les analyses QTL

La carte génétique IR64 x Azucena utilisée pour cette analyse est constituée de 226 marqueurs microsatellites couvrant 1652.06 cM du génome avec en moyenne une distance génétique de 7,31 cM entre marqueurs. La cartographie de QTLs basée sur analyse ANOVA a montré que les souches Africaines de Xoo ont induit cinq QTLs de résistance sur les chromosomes 1, 4, 7, 10 et 11. La cartographie par intervalle composé à l'aide du logiciel WinQTLCartographer 2.5 a mis en évidence les mêmes QTLs allumés par les souches Africaines de Xoo. L'estimation des effets additifs a montré que tous ces QTLs dérivent du parent IR64. Le QTL du chromosome 1 est spécifiquement induit par MAI1, la souche Malienne de Xoo, et est lié aux marqueurs RM129 et RM493 avec un LOD score de 4,72. Il contrôle 8% de la variance phénotypique. RM125 et RM214 sont les marqueurs flanquant le QTL du chromosome 7 commun aux souches MAI1 et BAI4 avec des LOD score respectifs de 16,20 et 13,98. Il contrôle 30% de la résistance à ces deux souches bactériennes. Le QTL du chromosome 11 est impliqué dans la résistance contre toutes les souches Africaines avec des LOD score variant entre 4,18 et 5,87. Il contrôle 7 à 14% de la variance phénotypique. Il est lié aux marqueurs RM224 et RM144. Le « inclusive composite interval mapping », a été fait à l'aide du logiciel Qgene-4.3.0. Cette méthode a l'avantage de mettre en évidence plusieurs QTLs proches. Cette analyse a mis en évidence les mêmes QTLs : celui du chromosome 1 est spécifique à MAI1, ceux des chromosomes 9 et 10 sont spécifiques à NAI8, celui du 7 contrôlant 36,6% de la variance phénotypique est commun aux souches MAI1 et BAI4 et celui du chromosome 11 commun à toutes les souches Africaines utilisées.

Cette analyse a également mis en évidence cinq QTLs impliqués dans la résistance contre les souches Asiatiques. Quatre de ces QTLs sont différents de ceux allumés par les souches Africaines à l'exception de celui du chromosome 11 qui est aussi induit par la souche Asiatique PXO61. Cette dernière allume spécifiquement un QTL sur le chromosome 4. La souche Asiatique PXO86 a induit des QTLs sur les chromosomes 5, 8 et 12 (Tableau III-1). Contrairement aux QTLs induits par les souches Africaines, ceux allumés par les souches Asiatiques dérivent du parent Azucena à l'exception du QTL du chromosome 12 dont le parent donneur est IR64. Les marqueurs flanquant ces QTLs, leurs effets additifs de même que leur LOD score et la variance phénotypique qu'ils contrôlent sont consignés dans le Tableau III-1.

Tableau III-1: Caractéristiques des nouveaux QTLs de résistance aux souches africaines et asiatiques de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* qui sont cartographiés dans la population IR64 x Azucena et en utilisant le logiciel Qgene-4.3.0

Xoo = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Xoo Strains	Origin	QTL localisation	LOD score	Linked marker	Additive effect	Donor Allele	PVE (%)
MAI1	African	Chromosome 1	5.068	RM129	1.7	IR64	13.40
		Chromosome 7	16.006	RM125	3.2	IR64	36.6
		Chromosome 11	4.666	RM144	1.5	IR64	12.4
BAI4	African	Chromosome 7	13.943	RM125	3.5	IR64	33.4
		Chromosome 11	4.68	RM144	1.8	IR64	12.8
BAI3	African	Chromosome 11	5.728	RM144	2.5	IR64	15.3
NAI8	African	Chromosome 9	4.359	RM242	2.3	IR64	12.9
		Chromosome 10	3.606	RM294A	-2.23	Azucena	10.8
		Chromosome 11	6.03	RM144	2.7	IR64	17.4
PXO86	Asian	Chromosome 5	4.209	RM440	-1.68	Azucena	11.5
		Chromosome 8	4.957	RM281	-2.16	Azucena	13.4
		Chromosome 12	4.869	RM512	1.9	IR64	13.2
PXO61	Asian	Chromosome 4	3.403	RM252	-1.7	Azucena	10
		Chromosome 11	36.78	RM144	7.3	IR64	67.9

PVE = Pourcentage de variance expliqué

III-3 Répertoire des gènes et QTLs de résistance autrefois identifiés contre les souches Asiatiques de *Xoo*

Au total, 35 gènes de résistance et 17 QTLs ont été identifiés contre les souches asiatiques de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Leurs origines et leurs positions génétiques et physiques sont résumées dans le Tableau III-2. Leur interpolation sur la carte génétique IR64 x Azucena est résumée sur la figure III-1.

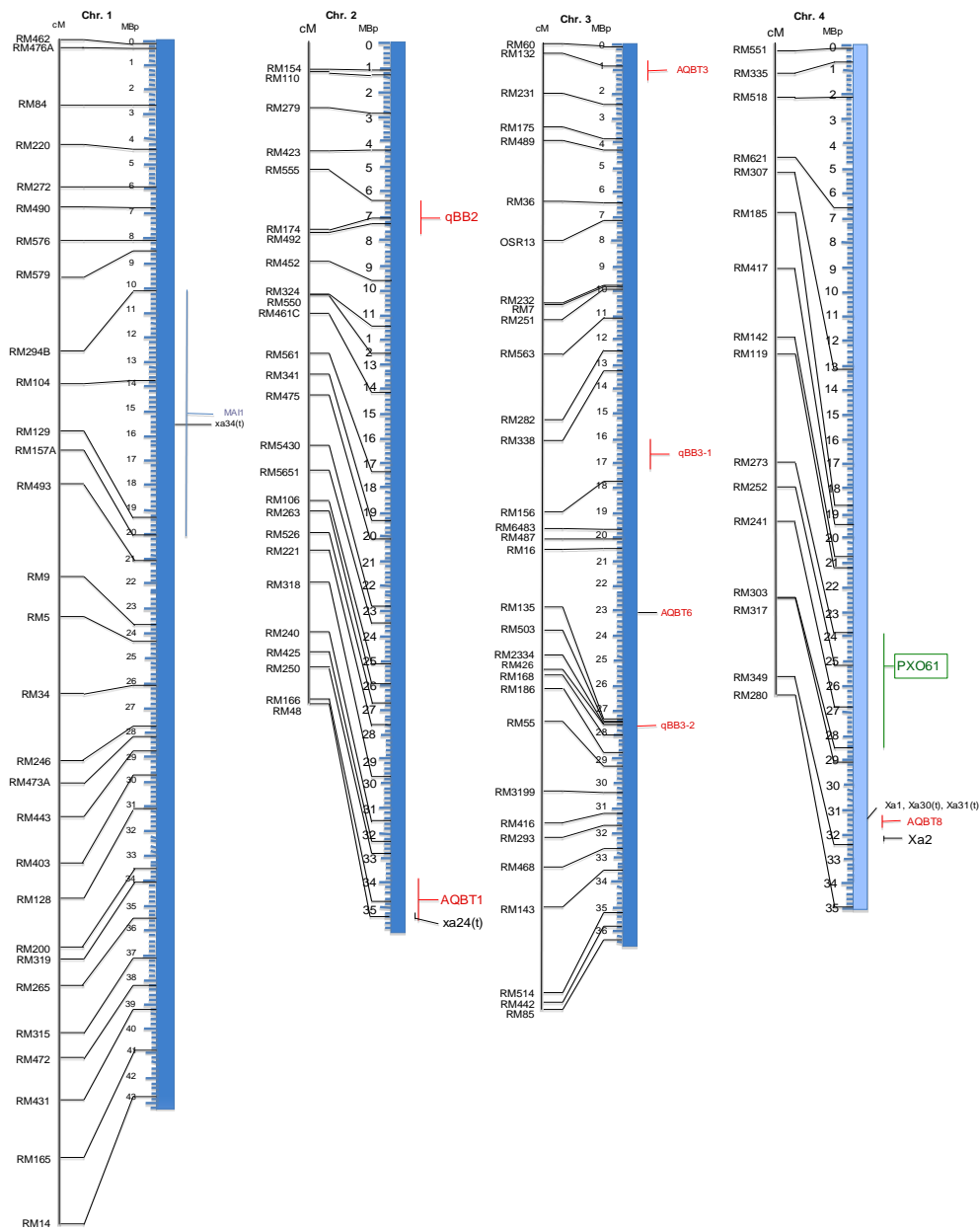


Figure III-1: Carte physique Nipponbare de tous les QTLs et gènes de résistance à la bactériose vasculaire du riz en Afrique et en Asie (Chromosomes 1 à 4).

Les traits verticaux épais bleus représentent la carte physique de chaque chromosome et sont reliés aux cartes génétiques portant à gauche, les marqueurs microsatellites RM. A droite de chaque carte physique, se trouvent les gènes et QTLs. En noir, les gènes autrefois identifiés contre les souches asiatiques de *Xoo*. Ceux qui sont déjà clonés sont directement reliés par un trait horizontal à un point précis de la carte physique. Les non clonés y sont reliés par des traits verticaux indiquant l'intervalle de confiance. En rouge, les QTLs détectés d'autres populations. En bleu, sont les QTLs identifiés contre les souches africaines de *Xoo* dans la présente étude, en vert, ceux des souches de référence PXO61 et PXO86

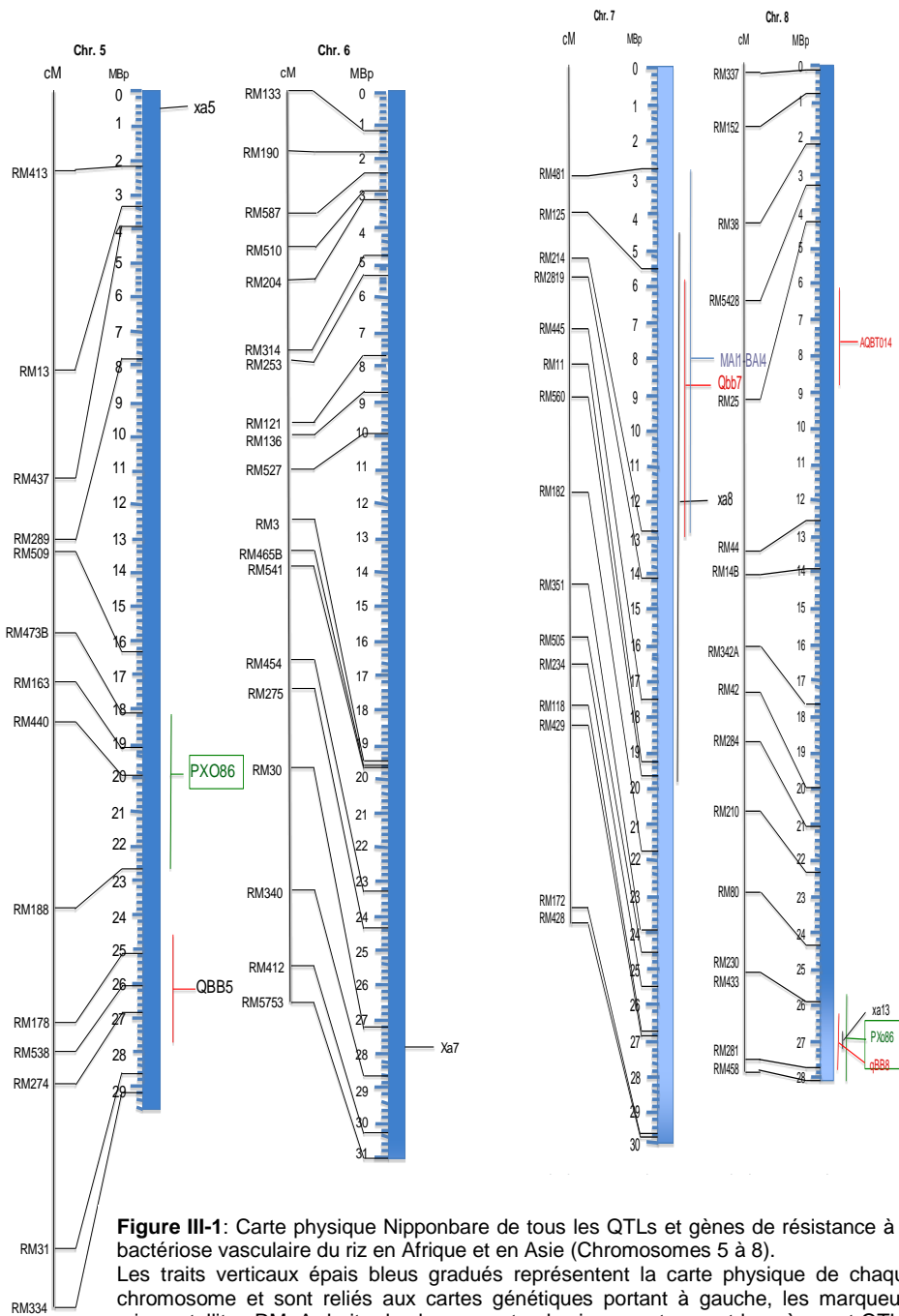


Figure III-1: Carte physique Nipponbare de tous les QTLs et gènes de résistance à la bactériose vasculaire du riz en Afrique et en Asie (Chromosomes 5 à 8).

Les traits verticaux épais bleus gradués représentent la carte physique de chaque chromosome et sont reliés aux cartes génétiques portant à gauche, les marqueurs microsatellites RM. A droite de chaque carte physique, se trouvent les gènes et QTLs. En noir, les gènes autrefois identifiés contre les souches asiatiques de *Xoo*. Ceux qui sont déjà clonés sont directement reliés par un trait horizontal à un point précis de la carte physique. Les non clonés y sont reliés par des traits verticaux indiquant l'intervalle de confiance. En rouge, les QTLs détectés d'autres populations. En bleu, sont les QTLs identifiés contre les souches africaines de *Xoo* dans la présente étude, en vert, ceux des souches de référence PXO61 et PXO86

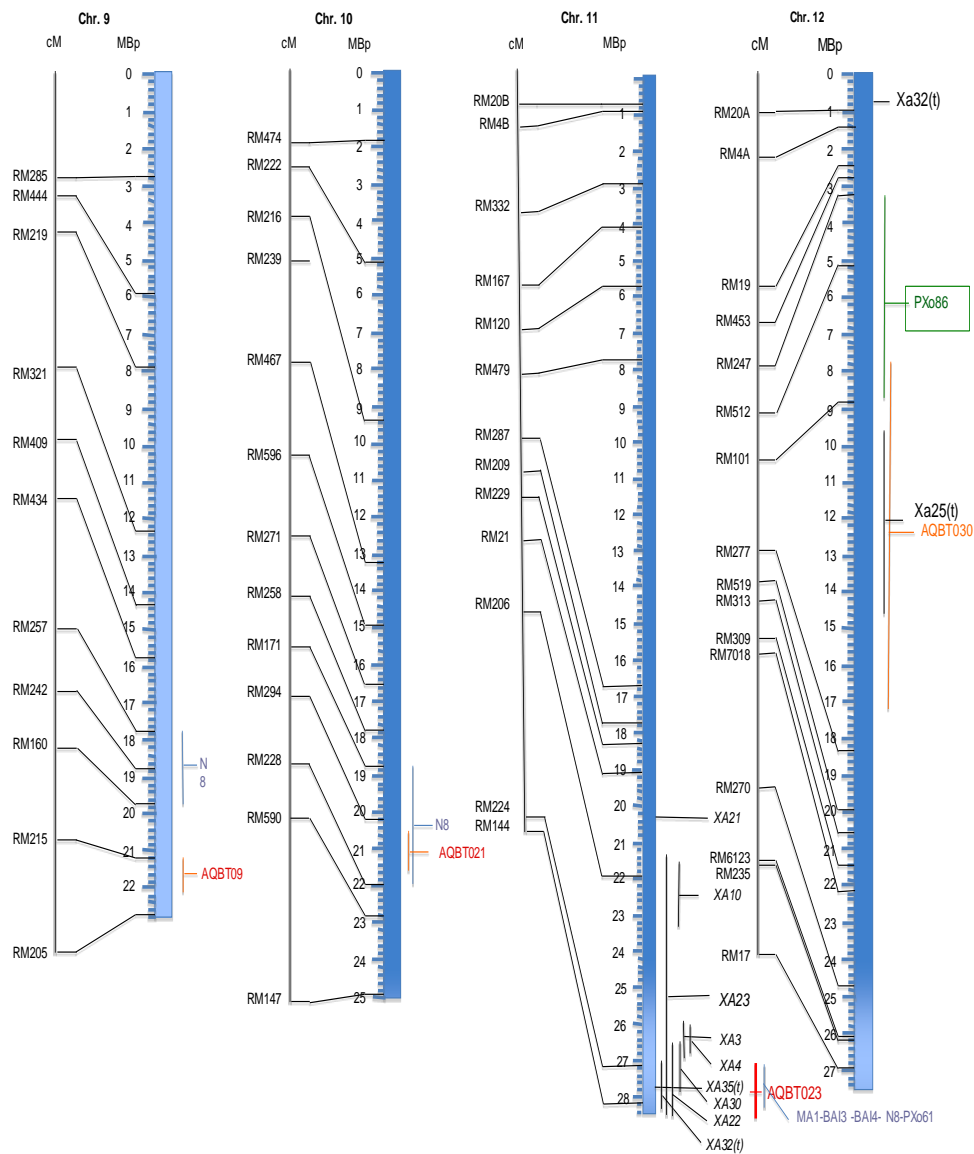


Figure III-1: Carte physique Nipponbare de tous les QTLs et gènes de résistance à la bactériose vasculaire du riz en Afrique et en Asie (Chromosomes 9 à 12).

Les traits verticaux épais bleus gradués représentent la carte physique de chaque chromosome et sont reliés aux cartes génétiques portant à gauche, les marqueurs microsatellites RM. A droite de chaque carte physique, se trouvent les gènes et QTLs. En noir, les gènes autrefois identifiés contre les souches asiatiques de *Xoo*. Ceux qui sont déjà clonés sont directement reliés par un trait horizontal à un point précis de la carte physique. Les non clonés y sont reliés par des traits verticaux indiquant l'intervalle de confiance. En rouge, les QTLs détectés d'autres populations. En bleu, sont les QTLs identifiés contre les souches africaines de *Xoo* dans la présente étude, en vert, ceux des souches de référence PXO61 et PXO86

IV- Discussion

Au cours de ces travaux, des QTLs de résistance aux souches Africaines et Asiatiques de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ont été cartographiés. Tous les gènes et QTLs de résistance préalablement identifiés contre les souches Asiatiques de *Xoo* ont été répertoriés de même que leurs parents donneurs, leurs positions génétiques et les fonctions de ceux qui ont été déjà clonés. L'analyse de QTLs à partir de la population de cartographie constituée de lignées recombinantes obtenues par croisement entre IR64 et Azucena a révélé différents QTLs de résistance contre les souches Africaines de *Xoo*. Les souches Africaines ont induit cinq QTLs dont quatre sont différents de ceux induits par les souches Asiatiques à l'exception du QTL du chromosome 11 qui leur est commun. Ces résultats montrent que la réaction des souches Africaines de *Xoo* est différente de celles d'Asie. Ils confirment les observations de Gonzalez et al. (2007). En effet, ces auteurs ont fait la caractérisation génétique d'une collection de *Xoo* et ont démontré que les souches Africaines diffèrent de celles d'Asie par leur nombre réduit de TAL (transcription activator-like) et d'éléments d'insertion dans leur génome. Les travaux de Hajri et al. 2011 et ceux de Triplett et al. 2011 ont également mis en évidence la différence entre ces souches. La variété de riz IR64 de la sous-espèce indica est le donneur de la résistance contre les souches Africaines de *Xoo* alors que les QTLs induits par les souches Asiatiques de *Xoo* proviennent de l'allèle d'Azucena, une variété de riz asiatique de la sous-espèce japonica. Deux de ces QTLs sont particulièrement intéressants à savoir les QTLs des chromosomes 7 et 11. Le premier induit par les races A2 et A3 de *Xoo* semble spécifique aux souches africaines et contrôle 37% de la variation phénotypique avec un LOD score de 16 (Tableau III-1). Ce LOD score très élevé par rapport au seuil de 2,5 ou 3 de plusieurs études de QTL (Wang *et al.*, 2006) met en évidence la robustesse du QTL du chromosome 7. Le QTL du chromosome 11, est impliqué dans la résistance contre toutes les souches Africaines de *Xoo* testées y compris celles de la race A1 particulièrement virulente sur le riz cultivé Africain *Oryza glaberrima* (Djedatin *et al.*, 2011). La cartographie fine de ces QTLs est en cours. L'étude de ségrégation a révélé que ces QTLs sont récessifs contrairement à la majorité des gènes de résistance aux souches Asiatiques de *Xoo* qui sont dominants. Une fois la cartographie fine terminée, ces deux QTLs pourront être utilisés pour l'amélioration de la résistance de variétés de riz sensibles à la bactériose en Afrique de l'ouest car aucun gène de résistance à la bactériose n'a été déployé en Afrique à travers des programmes de sélection. Inversement, en Asie, plusieurs gènes de résistance ont été pyramidés, dans des méga variétés de riz sensibles, par la sélection assistée par marqueurs. C'est le cas de Xa7 et Xa21 (Zhang *et al.*, 2006), xa5, xa13 et Xa21 (Sundaram *et al.*, 2009), Xa4, xa5, xa13 et Xa21 (Shanti *et al.*, 2010). Cette étude a également montré une différence de virulence entre les souches Africaines et Asiatiques de *Xoo*. Le contraste phénotypique entre parents résistant et

sensible est beaucoup plus marqué avec les souches Africaines que celles Asiatiques de *Xoo*. En effet, la différence de longueur de lésion provoquée par les souches Africaines sur les parents IR64 et Azucena est d'au moins 15 cm alors que celle induite sur ces mêmes parents par les souches Asiatiques de *Xoo* est d'environ 5 cm (Ramalingam *et al.*, 2003).

Concernant les gènes de résistance aux souches Asiatiques déjà connus, leur interpolation sur la carte génétique IR64 x Azucena montre qu'ils sont inégalement répartis sur les chromosomes du riz. Alors que cinq et neuf gènes des 22 cartographiés sont localisés respectivement sur les chromosomes 4 et 11, aucun gène n'a été décrit sur les chromosomes 3, 8, 9 et 10. Les chromosomes 4 et 11 sont connus pour avoir des associations de gènes de résistance RGA (resistance genes analogs) (Mago *et al.*, 1999; Ghazi *et al.*, 2009). Entre autre gènes ou QTLs, on peut citer le QTL de résistance au flétrissement de la gaine (Zou *et al.*, 2000) et les gènes de résistance à la pyriculariose (Wang *et al.*, 1994).

Ces QTLs et gènes de résistance ont été identifiés dans des fonds génétiques très variés de riz aussi bien sauvage que des sous-espèces indica et japonica de l'espèce cultivée asiatique *O. sativa*. Parmi les dix sept QTLs de résistance, dix ont été identifiés dans la population de lignées recombinantes issues du croisement Lemont x Teqing et sept dans la population d'haploïdes doublés IR64 x Azucena. Parmi les dix identifiés dans la population Lemont x Teqing, seuls trois proviennent de l'allèle de Lemont, une variété de la sous-espèce japonica et sept dérivent de Teqing, un indica. Par contre, les sept QTLs de résistance identifiés dans la population HD IR64 x Azucena dérivent d'IR64 qui est aussi un indica. De même, la plupart des gènes de résistance ont été identifiés dans un fond génétique indica. En effet, douze ont été identifiés dans des variétés indica, trois dans japonica et sept chez des types sauvages (Tableau III-2). Ces résultats montrent clairement que la résistance à la bactériose vasculaire dépend du fond génétique du riz. Les variétés de la sous-espèce indica du riz asiatique *O. sativa* apparaissent donc comme la meilleure source de résistance contrairement au riz cultivé africain *O. glaberrima* qui a montré une base génétique très étroite de la résistance au BB (Djedatin *et al.*, 2011).

Les QTLs et gènes contrôlent la résistance contre plusieurs races de *Xoo* d'origine Asiatique notamment des Philippines mais aussi de la Chine et de la Corée. Les QTLs identifiés dans la population Lemont x Teqing sont efficaces contre les souches Coréennes de *Xoo* alors que ceux dérivant de la population IR64 x Azucena contrôlent la résistance contre les souches de Philippines. Quant aux gènes majeurs de résistance, plus de la moitié ont été cartographiés grâce aux souches *Xoo* de Philippines qui sont largement utilisées.

De nombreux QTLs sont liés à des gènes majeurs de résistance. C'est le cas de *Xa1* et *Xa2* qui encadrent le QTL AQBT008 sur le chromosome 4. Certains d'entre eux sont considérés comme des gènes majeurs. C'est le cas de AQBT023 considéré comme *Xa4* sur la carte

génétiq ue Lemont x Teqing (Li *et al.*, 1999) mais qui, en réalité, est bien distinct de *Xa4* après interpolation sur IR64 x Azucena. Ce travail d'interpolation des gènes *Xa* connus, sur la carte IR64 x Azucena, apporte donc une expertise avérée en particulier sur la position exacte des différents gènes *Xa* et QTLs de résistance à la bactériose vasculaire du riz. Cette interpolation sur la carte génétique IR64 x Azucena met en évidence les QTLs et gènes de résistance communs aux souches Africaines et Asiatiques de *Xoo* et ceux qui leur sont spécifiques. En effet, le gène de résistance *xa34(t)* efficace contre les souches chinoises de *Xoo* appartenant à la race V colocalise avec *qMAI1*, le QTL de résistance induit par la souche Africaine MAI1 sur le chromosome 1. De même *qNAI8*, le QTL induit par la souche Africaine NAI8 colocalise avec AQBT021, un QTL de résistance induit par des souches Asiatiques sur le chromosome 10. Lemont et Azucena, les parents donneurs respectifs de AQBT021 et *qNAI8*, étant toutes les deux des variétés de riz appartenant à la sous-espèce japonica, on pourrait penser que ces deux QTLs sont identiques. Les loci de *xa8* et *qBB7* (induits par des souches Asiatiques de *Xoo*) et ceux de *qMAI1* et *qBAI4* (induits par des souches Africaines de *Xoo*) chevauchent sur le chromosome 7 tout comme *xa24* et AQBT001 sur le chromosome 2. Sur le chromosome 8, le gène *xa13* et les QTLs *qBB8* et *qPXO86* colocalisent parfaitement. Le gène majeur récessif *xa13* pourrait donc être impliqué dans la résistance contrôlée par ces deux QTLs dont l'hérédité n'est pas encore connue. Au niveau du chromosome 11, le QTL induit par les souches Africaines de *Xoo* colocalise avec les gènes de résistance *Xa3*, *Xa4*, *Xa32* et *xa35(t)* identifiés contre des souches Asiatiques de *Xoo*. Ces résultats indiquent que certains gènes majeurs contribuent à la résistance quantitative. C'est le cas du haricot où des RGAs colocalisent avec un QTL de résistance à l'antracnose (Geffroy *et al.*, 2000). C'est aussi le cas de QTL associé à la résistance contre le *Barley yellow dwarf virus* chez l'orge (Toojinda *et al.*, 2001), et de la résistance partielle au *Cucumber mosaic virus* chez le poivron (Pflieger *et al.*, 1999). Les gènes de résistance identifiés contre les souches Asiatiques de *Xoo* et qui colocalisent avec des QTLs induits par les souches Africaines dont la cartographie fine est en cours, pourront être utilisés pour développer des variétés de riz résistantes à la bactériose vasculaire en Afrique de l'ouest.

Conclusion

L'étude de la résistance du riz à la bactériose vasculaire a permis de cartographier plusieurs QTLs de résistance aux souches africaines et asiatiques de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Ces QTLs sont répartis sur plusieurs chromosomes du riz. L'interpolation des QTLs et gènes de résistance autrefois identifiés contre les souches asiatiques de *Xoo* sur la carte génétique IR64 x Azucéna, ayant servi à cartographier les QTLs au cours de cette étude, a montré que certains QTLs sont spécifiques aux souches africaines de *Xoo* alors que d'autres sont communs à des souches africaines et asiatiques de *Xoo*. Le riz asiatique *Oryza sativa* de la sous-espèce indica constitue une base génétique de la résistance à la bactériose vasculaire. Deux des QTLs sont particulièrement importants. Le premier est celui du chromosome 7 induit par les races A2 et A3 de *Xoo* d'origine africaine et contrôlant 37% de la variation phénotypique et le deuxième, celui du chromosome 11 impliqué dans la résistance contre toutes les souches africaines de *Xoo* testées. Afin d'utiliser ces QTLs pour l'amélioration de la résistance de variétés élites de riz sensibles à la maladie, leur cartographie fine s'avère indispensable. Dans cette logique, le prochain chapitre a donc pour objet la cartographie fine de ces deux importants QTLs identifiés au niveau des chromosomes 7 et 11 du riz.

Tableau III-2: Liste des gènes et QTLs de résistance identifiés contre les souches asiatiques de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*

Accession Number	Symbol	Synonym	Donor Parent	Linkage Groupe	Genetic Position (cM)	Colocalized Marqueurs	Flanking Markers	Physical Position (bp)	Integrative map	Interpolation
NA	xa34 (t)		BG1222 (indica)	1		BGID34 and BGID36	RM10929 and BGID25 separated by 0.4 cM	15,500,312-15,500,686 (for RM10929)		
AQW001	qBB2		IR64 (indica)	2	0-6.5	RG437	RG544	RG544 : 10,503,368-10,503,846	RG437, previously mapped to 6.5 cM was located to 36.3 cM on JRGPRFLP 2000 and 34.88 cM on integrative map.	interpolated between 30,5 and 34,88 (RG457) on IM
AQBT001			Teqing (indica)	2	232.9-251.7	RG654; RG520	RG256; RM138	33,849,901-35,662,199	RG654 mapped to 122.82	In silico mapped between RG654 and RG520
GR:0061033	XA24	xa24(t)*; rXa22; xa24; <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae resistance -24</i>	DV86 (indica)	2			RM14213; RM14222 - RM14226	35,602,991-35,603,126 (for RM14213) and 35,775,489-35,775,773 (for RM14226)		in silico mapped RM14213 and RM14226

AQBT003		Lemon (japonica)	3	2.2 - 7.3	C515, RG348	RG104, C636	718,777- 1,450,227		in silico mapped between C515 andRG348
AQW002	qBB3-1	IR64 (indica)	3	95.6 - 99.7	RZ394	RZ284 ; r9	15,469,002- 15,472,481		interpolated from I x A integrated map between 88,92 and 92, 04 positions
AQW003	qBB3-2	IR64 (indica)	3	135.9 - 135.9		RZ403 ; CDO337	23,088,332- 28,232,092		interpolated from I x A integrated map at 126,8 position
AQBT006		Teqing (indica)	3	174-178.7	RZ403 - RG482		23,088,332- 23,088,721	RZ403 mapped to 101.93 cM while RG482 at 101.42 cM: reversal markers positions.	interpolated from I x A integrated map between RZ403 and RG482
NA	Xa30(t)	<i>Oryza nivara</i> Acc. IRGC 81825	4			RM17499 and RM17502 separated by 4 cM /LOC_Os04 g53060 and LOC_Os04g 53120	31,420,296- 31,424,764 (for LOC_Os04g 53060 gene) and 31,452,992- 31,459,688 (for		In silico mapped on loc Os4g53060

								LOC_Os04g 53120)	
NA	Xa31(t)		<i>Zhachanglong (ZCL)</i> (japonica)	4			C600 and G235 separated by 0.2 cM	31,460,125-31,460,471 (for C600) and 31,471,245-31,471,486 for G235	In silico mapped between C600 and G235 from Nip x Kas 2001
AQBT012			Lemon (japonica)	4	14.4 - 27.7	RG190; RG1094; RZ69	RM307; RG449	8,610,617-11,234,543	in silico mapped between RG190 and RZ69
AQBT008			Teqing (indica)	4	151.6 - 158.2	RG214	G379; G177	G379: 31,662,839-31,663,326	interpolated from lemon x teqing between 151.6 to 158.2 positions
GR:0061011	XA1	Xa1 ; Xa-1, RXa1, Xe	Kogyoku (japonica)	4	108.2 – 108.2	C600; G260	Y5212L- Y5212R	31,452,992-31,459,688	in silico mapped from C600 in Nip x Kas F2 QTL (107,35 cM)
GR:0061012	XA2	RXa2	Te-tep (indica)	4	105.9 – 109.9		V192A- E10736		in silico mapped between V192A and E10736

AQW004	qBB5		IR64 (indica)	5	130.1 - 139.5	RZ70	RZ67; RZ225	24,261,900- 24,262,670	interpolated from I x A integrative map between RZ70 and 140,77 cM position
GR:0061015	XA5	Rxa5 ; xa5	DZ192 (indica)	5			RS7-RM611	437,010- 443,270	
GR:0061464	<i>Xa27(t)</i> , <i>RXa31</i>	<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> <i>pv.oryzae</i> <i>resistance</i> <i>27</i> ; <i>Xa27(t)*</i>	<i>Oryza</i> <i>minuta</i> <i>Acc.</i> <i>101141</i> <i>cloned</i> <i>from</i> <i>IRBB27</i>	6	85.4		M964 and M1197 with 0.052 cM Interval		
NA	xa33 (t)		Ba7 (indica)	6		RM2050	RM30, RM400, RM5509, RM7243	RM20590: 28,015,526- 28,015,869	
GR:0061016	XA7	RXA6; Xa7	DV85 (indica)	6		RM20589; RM20590; RM20591	GDSSR02 - RM20593	28,005,929- 28,006,192	
GR:0061017	XA8	xa8; rXa7	PI231129	7	14.8 -54.6	RG773, RM125, RG477, RM501, RM325B, RM214, RM542, RM500, RM2, RM533,	4200000 - 19304258		RG773 mapped to 3.20-17.70 cM in Cornell SSR 2001 was mapped to 2.99 cM in integrative map. RG477

					RM445, RM418, RM432, RM11, RM560			mapped to 30.10 cM in Cornell SSR 2001 was mapped to 5.99 cM in integrative map.
AQW005	qBB7	IR64 (indica)	7	62.4 - 71.6	RG477	RZ488; S2AS3A3	6,779,215- 6,779,821	
AQBT014		Teqing (indica)	8	52.1 - 67	G104; G1314	CSU754; G2140	G104: 8,923,052- 8,924,004	Interpolated from I x A integrative map between G104 and 56,57 position
AQW006	qBB8	IR64 (indica)	8	109.3 - 121.2	CDO99	RG418	27,822,512- 27,825,271	Interpolated from I x A integrative map between rNBS35 and CDO99
AQBT019		Teqing (indica)	9	173.5 - 177.7	RZ404; RG451	RM205	22,194,746- 22,196,064	
AQBT021		Lemon (japonica)	10	137.1 - 144.2	RG1094; C16	RG752; RG561	21,098,188- 21,099,881	
GR:0061018	XA10	RXa8; Xa10	CAS209 (indica)	11	96.50 - 106.40	US109; RZ537; C6; RG1109, CDO520		RZ537, ISU109 and Xa10 were mapped to 64.69 cM while CDO520 and RG1109

								were mapped to 72.59 cM, then far from Xa10	
GR:0061358	Xa26(t) RXa30	Xa26(t)*	Minghui 63 (indica)	11		RM224 at 0.21 cM from Xa26 (t) and Y6855RA at 1.47 cM from Xa26 (t)	R1506, the co-segregated marker 27,532,002-27,532,363	In the map based on RIL Zhenshan 97/Minghui 63, R1506 was mapped to 0.21 cM to RM224 whereas in integrative map, R1506 and RM224 were located at 99.57 and 93.77 cM respectively	
AQBT026			Teqing (indica)	11	23.4 - 28	RG1022; C975	RM20; RM167		
AQBT023	Xa4		Teqing (indica)	11	265.2 - 274.8	G2132; RZ536	L457	28,409,788-28,412,347	In the integrative map, Xa4 was different to AQBT023
GR:0061013	XA3	Xa3 ; Xaw ; Xa6 ; xa9 ; Rxa3 ; Xa4-b; Xanthomonas oryzae pv.oryzae resistance 3	Chugoku4 5; Wase Aikoku 3 (japonica)	11	109.8 – 114.4	C950 ; Y6854L	HZR950-5 – HZR970-4		

GR:0061014	XA4	Xa4 ; Xa4-a ; Rxa4	TKM6; IR20; Teqing (indica)	11	110.4 – 113.8	G181 ; L1044			R1506 mapped to 99.57cM (5cM far from RM224) whereas it was very closed de RM224 according to Sun X et al (2003)
GR:0061029	XA21	<i>RXa19; Xanthomonas oryzae pv.oryzae resistance 21</i>	<i>O. longistaminata (originally reported as O. barthii)</i>	11				20,336,827-20,340,411	
GR:0061030	Xa22		<i>Zhachanglong (ZCL) (japonica)</i>	11	112.80 - 119.5	R1506; Y6854L; Y6855RA; Y6855RB; G3002	G181		R1506 was mapped to 99.57 cM in integrative map while it was mapped to 116.20 cM in <i>O. sativa</i> JRGP RFLP 2000
GR:0061031	XA23	<i>Xa23; RXa21; Xa23(t); Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	<i>O. rufipogon</i>	11	95.70 - 124.90	RM224; G1465; RZ537; L190	C1172; RG103X	20644263 - 20645912	G1465 mapped to 77.42 cM in integrative map was mapped to 113.10 cM in

<i>resistance</i> -23							sativa x longistaminata RFLP map	
NA	<i>Xa 35 (t)</i>		<i>O. minuta</i> Acc. No. 101133	11	RM144	RM6293 at 0.7 cM to <i>Xa35</i> and RM7654 at 1.1 cM to <i>Xa35</i>	28,281,693- 28,281,937	
AQBT029			Teqing (indica)	12	58.5 - 110.2	RG869; RM104; RM155; RM277; RM260; G402; RG20; RG91	L102, RG901	7,729,365- 21,041,065
GR:0061188	<i>Xa25</i>	<i>Xa25(t)</i>	Minghui 63 (indica)	12		G1314; R887, G1128	R877 mapped to 3 cM to <i>Xa25 (t)</i> accrding to Chen et al 2002, was located at 53 cM in integrative map	
NA	<i>Xa32(t)</i>		<i>Oryza</i> <i>meyeriana</i> L.	12		RM8216 and RM20A mapped on the same side of <i>Xa32(t)</i> at 6.9 and 1.7 cM respectively	RM20A: 970,538- 970,958	

Chapitre IV

Hérédité et cartographie fine des QTLs des chromosomes 7 et 11

Résumé

Le QTL du chromosome 7, impliqué dans la résistance contre les races A2 et A3 de *Xoo* africaines et contrôlant 37% de la variation phénotypique, a été isogénisé. Une population de cartographie fine a été développée. L'étude de descendance a montré qu'il s'agit d'un QTL à hérédité récessive. Sa cartographie a mise en évidence le marqueur microsatellite RM214 qui lui est associé. Les analyses génétiques et de cinétique de croissance bactérienne ont montré que le QTL du chromosome 11 impliqué dans la résistance contre toutes les races africaines de *Xoo* est aussi gouverné par un gène récessif. Ce gène reste associé au marqueur microsatellite RM144.

I- Introduction

La mise au point de variétés résistantes et leur déploiement dans l'agriculture constitue le moyen de lutte le plus efficace contre les maladies dont la bactériose vasculaire du riz. Les souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sont génétiquement différentes de celles d'Asie (Gonzalez *et al.*, 2007, Hajri *et al.*, 2011, Triplett *et al.*, 2011). La recherche de sources de résistance spécifiques aux souches africaines de Xoo en criblant des accessions de riz africain *Oryza glaberrima* a montré que le riz africain constitue une source de résistance très étroite (Djedatin *et al.*, 2011) alors que le riz cultivé asiatique *Oryza sativa* sous-espèce *indica* représente une bonne source de résistance. La caractérisation de la base génétique de cette résistance chez le riz asiatique a conduit à la cartographie de plusieurs QTLs de résistance aux souches africaines de Xoo (Djedatin *et al.*, soumis). Deux de ces QTLs revêtent un intérêt particulier. En effet, le QTL du chromosome 7, induit par les souches BAI4 (race A2) et MAI1 (race A3), contrôle 37% de la variance phénotypique. Quant à celui du chromosome 11, il est impliqué dans la résistance contre toutes les souches africaines de Xoo testées appartenant aux trois races africaines A1, A2 et A3. L'utilisation de ces QTLs dans la riziculture passe d'abord par leur cartographie fine. En effet, la cartographie fine constitue une étape cruciale dans la marche vers le clonage de gène (Song *et al.*, 1995; Yoshimura *et al.*, 1998; Yano *et al.*, 2000; Monna *et al.*, 2002). La cartographie de grande résolution est très utile pour la précision de la position d'un gène d'intérêt et de l'analyse du taux de recombinaison d'une région chromosomique. Elle est surtout utile pour sélectionner des combinaisons de marqueurs pour la sélection assistée par marqueur dans les programmes d'amélioration génétique des plantes. L'objectif de ce chapitre est donc de faire la cartographie fine des deux QTLs afin d'identifier les marqueurs associés à la résistance qui pourront être utilisés dans des programmes d'amélioration variétale et servir à identifier des gènes candidats.

II- Matériel et méthodes

II-1 Dissection du QTL 7

II-1-1 Développement de populations de cartographie fine

En vue d'isogéniser le QTL du chromosome 7, une lignée recombinante dérivée du croisement IR64 (résistant) x Azucena (sensible) par la méthode SSD (Single Seed Descent) a été sélectionnée pour développer des populations de cartographie. Il s'agit de la lignée SSD90. La SSD90 (63% du génome d'Azucena et 37% d'IR64) de phénotype résistant, porte l'allèle

résistant à certains loci du QTL7 et l'allèle sensible à tous les loci des QTL 1 et 11; ce qui élimine tout effet d'épistasie avec ces QTLs (Tableau IV-1). Elle a été rétrocroisée avec Azucena qui est le parent récurrent. Deux cent trente six familles F_3 ont été développées à partir des pseudos F_1 .

Tableau IV-1 : Génotype aux différents loci des QTLs des chromosomes 1, 7 et 11, de la lignée recombinante SSD90 ayant servi à développer la population de cartographie fine.

QTLs	chromosome 1		chromosome 7			chromosome 11	
Marqueurs	RM129	RM493	RM214	RM125	RM20787	RM445	RM144
IR64	B	B	b	B	B	B	B
Azucena	A	A	a	A	A	A	A
SSD90	A	A	b	B	A	A	A

IR64 : variété de riz ayant servi de parent donneur de la résistance

Azucena : parent sensible

II-1-2 Phénotypage des familles F_3

Soixante familles F_3 et les parents IR64 et Azucena ont été sélectionnés. Vint cinq grains par famille ou variété ont été semés et les plantes développées sous serre, en conditions contrôlées (80% d'humidité, 28°C et 8-10h/j d'ensoleillement). Les plantes âgées de six semaines ont été inoculées avec la souche bactérienne MAI1 de la race A3, comme précédemment décrit dans le chapitre II (Kauffman *et al.*, 1973). Les longueurs de lésion induite sont mesurées à l'aide d'une règle graduée, trois semaines après l'inoculation.

II-1-3 Identification de marqueurs polymorphes et génotypage des familles F_3

La recherche de marqueurs microsatellites polymorphes dans l'intervalle de confiance du QTL du chromosome 7 a été faite dans un premier temps in silico en utilisant <http://gramene.org/> et <http://orygene.org>. Un total de 235 marqueurs microsatellites (McCouch, 2002) situés entre RM21135 (en position 5015069 pb) et RM21422 (en position 12704718 pb) ont été sélectionnés. Pour chacun d'eux, des blast ont été faits sur la séquence de japonica et celle d'indica en utilisant la base de données « orygenedb ». Les marqueurs polymorphes in silico ont été ensuite amplifiés par PCR. Et c'est seulement ceux qui sont polymorphes par PCR qui ont été retenus pour le génotypage. En vue de valider la cartographie de ces marqueurs dans la population SSD ayant servi à cartographier les QTLs, ces marqueurs ont été utilisés pour génotyper 20 lignées sélectionnées au hasard parmi les 178 lignées de la population. Ces mêmes marqueurs ont

servi à génotyper les familles F₃. 10 ng/μl d'ADN génomique extrait à partir de jeunes feuilles de riz (Edwards et al. 1991) ont été utilisés dans 15 μL de réaction PCR (polymerase chain reaction) suivant le programme ci-après : dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min; 33 cycles (dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 55°C pendant 30 s, et élongation à 72°C pendant 1 min) et une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

II-2 Analyse fine du QTL du chromosome 11

II-2-1 Validation de *Xa4* au locus du QTL 11

II-2-1-1 Détection de QTL avec la souche Xoo PXO61

Au locus de ce QTL qui est impliqué dans la résistance contre toutes les races Africaines de Xoo testées, se trouve un cluster de gènes *Xa* dont *Xa3*, *Xa4*, *Xa21*. *Xa3* est inefficace contre la race A1 (Gonzalez et al., 2007) et *Xa21* a été identifié chez le riz sauvage *O. longistaminata*. *Xa4* reste alors le seul candidat potentiel à ce locus. Pour valider *Xa4* nous avons utilisé la souche Xoo PXO61 (Phil race 2) des Philippines qui allume de façon spécifique le gène *Xa4* sur le chromosome 11. En effet, la même population de cartographie constituée de 178 lignées recombinantes et ayant servi à cartographier les QTLs, a été criblée par la souche bactérienne BAI3 (race A1) d'origine Africaine. Le criblage a été fait en conditions contrôlées sous serre (28°C, 80% d'hygrométrie et 8-10h/j d'ensoleillement) à l'IRD de Montpellier. L'inoculation a été faite selon la méthode de Kauffman (1973) telle que décrite dans le chapitre 2.

II-2-1-2 Développement et criblage de population F₂: IR24 x IRBB4

La variété de riz asiatique IR24 de la sous-espèce indica a été croisée avec sa lignée isogénique IRBB4 porteuse de *Xa4* considérée comme parent donneur. Une population F₂ a été développée par autofécondation des hybrides F₁. Deux lots constitués chacun de 100 individus F₂ ont été criblés dans les conditions précédemment décrites ; le 1^{er} lot avec la souche BAI3 d'Afrique et le 2^{ème} lot avec la souche PXO61 d'origine asiatique.

II-2-1-3 Sélection de lignées recombinantes

Cinq cent individus de la population F₂ : IR24 x IRBB4 ont été génotypés avec un marqueur de *Xa4* dont les séquences se présentent comme suit :

MP1 : 5'ATCGATCGATCTTCACGAGG3'et MP2 : 3'...TGCTATAAAAGGCATTCGGG...5'. Ce marqueur a déjà été utilisé par Muhammad Arif et al. 2008 pour identifier des accessions de riz pakistanaises porteuses de *Xa4*. L'extraction de l'ADN, la PCR et l'électrophorèse sur gel d'agarose ont été faites telles que décrites dans le chapitre 2. Les lignées homozygotes résistantes *Xa4/Xa4* sélectionnées (supposées résistantes à la souche bactérienne PXO61) ont été criblées avec la souche Africaine Xoo BAI3. Les recombinants obtenus ont servi à développer des familles F₃: IR24 x IRBB4. Vingt cinq individus par famille ont été semés. Deux lots de semis ont été faits puis phénotypés respectivement avec les souches BAI3 et PXO61.

II-2-2 Cinétique de croissance bactérienne

II-2-2-1 Prélèvement de feuilles infectées

La variété IR24 et sa lignée isogénique IRBB4 ont été semées et inoculées 6 semaines après germination avec les souches BAI3 et PXO61. Juste après inoculation, un fragment de 5 cm est prélevé à partir de l'apex de feuille inoculée. Ensuite, deux, trois et quatre fragments de 5 cm à partir de l'extrémité de feuille inoculée ont été prélevés respectivement 4, 8 et 12 jours après inoculation. A chaque instant T, le prélèvement de feuilles infectées par BAI3 et PXO61 se fait sur trois plantes différentes d'IR24 et IRBB4.

II-2-2-2 Isolement et dénombrement des bactéries

L'isolement et la quantification du nombre de bactéries dans les tissus ont été faits suivant la méthode de Yu et al. (2011). Les feuilles infectées prélevées sont stérilisées par trempage dans de l'éthanol 70% pendant 5 à 10 secondes puis rincées à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite lyophilisées avec de l'azote liquide puis broyées dans des tubes eppendorf de 2 ml à l'aide d'un broyeur automatique à billes. Au broyat, s'ajoute 1ml d'eau stérile. Le contenu de chaque tube est homogénéisé par agitation puis laissé au repos pendant 1h, le temps que les bactéries sortent des tissus. Ensuite, une série de dilutions échelonnées a été faite de 1/10 à 1/10¹⁰. Pour chaque dilution, 10 µl de solution sont déposés en trois points différents sur du milieu de culture PSA. Les milieux PSA ensemencés sont incubés à 28°C jusqu'à l'apparition de colonies bactériennes. A chaque instant T, pour chaque souche et par variété, trois répliques biologiques ont été faites. Les colonies bactériennes sont comptées par point de 10 µl de broyat déposés sur du milieu PSA. Les moyennes et écart-types sont

calculés. Le nombre de colonies bactériennes par ml (CFU : colonie formant unite /ml) correspond à $N = C \times d \times 100$ avec C le nombre de colonies comptées, d le coefficient de dilution. Toute l'expérience a été répétée trois fois.

II-2-3 Exploration d'un gène de sensibilité : le cas du gene Os11N3

II-2-3-1 Induction du gène : inoculation par infiltration

L'infiltration est une autre méthode d'inoculation qui se fait à l'aide d'une seringue sans aiguille. La concentration de l'inoculum bactérien exprimée en densité optique DO est mesurée au spectrophotomètre. Mesurée à 600 nm, elle est de 0,2 ce qui correspond à 10^8 cfu/ml. La seringue est appliquée sur la face inférieure de la feuille. Une pression exercée sur le piston de la seringue permet la pénétration de la solution dans les tissus foliaires. Pour cette étude, IR24 et IRBB4 sont semées en serre et inoculées par une série d'infiltrations sur une longueur de 10 cm. Les souches bactériennes de *Xoo* utilisées sont BAI3 et PXO61 pour lesquelles IR24 est sensible et IRBB4 résistante. Comme témoin négatif, l'eau a été infiltrée aussi bien dans IR24 qu'IRBB4.

II-2-3-2 Extraction des ARN totaux

24h après infiltration, les feuilles infectées sont prélevées dans des tubes plongés directement dans de l'azote liquide afin d'éviter toute modification du profil d'expression des gènes provenant de la dégradation des ARN. Les feuilles sont broyées dans un mortier à l'aide d'un pilon, dans de l'azote liquide. L'extraction se fait à l'aide du kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) et suivant les instructions du fabricant. 100 mg du tissu broyé sont prélevés dans un tube de 2 ml, pré-refroidi, du Kit. L'azote liquide s'évapore sans que le tissu broyé ne dégèle. 450 µl de tampon RLT sont ajoutés au tissu et le tout est vigoureusement mélangé par vortex. Ce mélange est incubé au bain marie à 65°C pendant 3 min puis transféré dans une colonne QIAshredder placée dans un tube de collection de 2 ml. L'ensemble est centrifugé à vitesse maximale pendant 2 min. Le surnageant récupéré dans le tube de collection est soigneusement transféré dans un nouveau tube du Kit. Il a été ajouté au surnageant, la moitié de son volume en éthanol (96 à 100%). Les deux solutions sont immédiatement mélangées avec une pipette (sans centrifugation). Ce nouveau mélange est transféré sur une colonne placée dans un tube de collection de 2 ml et centrifugé à une vitesse de 9000 rpm pendant 15 s. La solution recueillie dans le tube de collection est jetée. 700 µl de tampon RW1 est versé dans la précédente colonne maintenue dans le tube de collection. Après centrifugation à une vitesse de 9000 rpm pendant 15 s, la membrane de la colonne est lavée et le liquide recueilli dans le tube de collection est jeté. Cette membrane est de nouveau lavée avec 500 µl du

tampon RPE comme précédemment décrit. Un dernier lavage de la membrane de la colonne a été fait à l'aide de 500 µl de tampon RPE, mais cette fois à une vitesse de centrifugation de 9000 rpm pendant 2 min. Cette longue durée de centrifugation permet de bien sécher la membrane et de s'assurer de l'élimination totale de l'éthanol qui pourrait interférer avec des réactions ultérieures. La colonne est ensuite placée dans un nouveau tube de collection et centrifugée à vitesse maximale pendant 1 min. Cette étape permet d'éliminer de probables résidus de tampon RPE. Cette colonne lavée et essorée plusieurs fois a été placée dans un nouveau tube de collection de 1,5 ml. L'ARN est ensuite récupéré dans de l'eau RNase-free du Kit. A cet effet, 40 µl de cette eau ont été ajoutés à la membrane de la colonne qui avait retenu l'ARN. L'ensemble est centrifugé à une vitesse de 9000 rpm pendant 1 min pour éluer l'ARN vers le tube de collection de 1,5 ml.

II-2-3-3 Evaluation de la quantité et de la qualité des ARN

La quantité des ARN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, le nanodrop. Leur qualité a été évaluée par électrophorèse en conditions non dénaturantes, sur gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE 0,5X à 100V pendant 45 min. Pour cette électrophorèse, des quantités égales de 500 ng de chaque échantillon d'ARN ont été utilisés. A cet effet, un volume V de chaque échantillon d'ARN a été prélevé puis mélangé à un volume V/5 de bleu de charge avec $V = 500/C$; C étant la concentration initiale (en ng/µl) de l'ARN mesurée au nanodrop. Le volume de chaque échantillon d'ARN prélevé de même que celui du bleu de charge ajouté sont résumés dans le Tableau IV-2.

Tableau IV-2: Volumes d'ARN et de bleu de charge prélevés pour l'électrophorèse sur gel d'agarose en vue d'évaluer la quantité et la qualité des ARN totaux extraits

Type de materiel	Volume V ARN (µl)	Volume V/5 bleu charge (µl)
A	7,78	1,56
B	5,68	1,14
C	3,68	0,74
D	5,52	1,11
E	1,28	0,26
F	2,64	0,53

A = IR24 inoculé avec de l'eau ; B = IR24 infecté avec la souche africaine de bactérie BAI3 ; C = IR24 infecté avec la souche bactérienne asiatique PXO61
D = IRBB4 inoculé avec de l'eau ; E = IRBB4 inoculé avec BAI3 ; F = IRBB4 inoculé avec PXO61

II-2-3-4 Traitement des ARN par DNase

Afin d'éviter des contaminations d'ADN génomique, 1 µg de chaque échantillon d'ARN est traité avec du DNase. Pour obtenir 20 µl d'ARN pur de chaque échantillon, les volumes initiaux d'ARN, de tampon de réaction RQ1 RNase-free DNase 10X, du RQ1 RNase-Free DNase et du nuclease-free water utilisés sont résumés dans le Tableau IV-3. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min. Ensuite, 1 µl de solution RQ1 DNase stop est ajouté au milieu réactionnel pour arrêter la réaction de digestion d'ADN. Le mélange est enfin incubé à 65°C au bain marie pendant 10 min afin d'inactiver le DNase.

Tableau IV-3 : Traitement des ARN totaux par le DNase : mix utilisé pour obtenir 20 µl d'ARN

Matériel	ARN	Tampon RQ1 RNase-free DNase 10X	RQ1 RNase- free DNase	Nuclease-free water
A	15,56	2	2	0,44
B	11,36	2	2	4,64
C	7,36	2	2	8,64
D	11,04	2	2	4,96
E	2,56	2	2	13,44
F	5,28	2	2	10,72

A = IR24 inoculé avec de l'eau ; B = IR24 infecté avec la souche africaine de bactérie BAI3 ; C = IR24 infecté avec la souche bactérienne asiatique PXO61 ; D = IRBB4 inoculé avec de l'eau ; E = IRBB4 inoculé avec BAI3 ; F = IRBB4 inoculé avec PXO61

II-2-3-5 Synthèse d'ADNc par transcription reverse (RT)

Pour cette synthèse, le Kit SuperScript™ « First-strand Synthesis System for RT-PCR » de Invitrogen a été utilisé. Dans un 1^{er} temps, 6 µl de chaque échantillon d'ARN précédemment traité avec du DNase ont été incubés avec 1 µl d'oligo (dT)₂₀ 50 µM et 1 µl de dNTP mix 10 mM à 65°C pendant 5 min. Le mélange est ensuite refroidi dans la glace pendant 3 min. Ensuite, le mix de synthèse d'ADNc a été préparé. Pour chaque échantillon d'ARN, ce mix est constitué de 4 µl de tampon RT (5X), 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de RnaseOUT™ (40 U/µl) et 1 µl de transcriptase reverse, SuperScript™ III RT (200 U/µl). Pour la synthèse de l'ADNc, ce mix a été ajouté au 1^{er} mélange (ARN +oligo (dT) +dNTP) et incubé à 50°C pendant 50 min. Pour arrêter la synthèse, la transcriptase reverse a été inactivée par incubation du mélange à 85°C pendant 5 min. Après refroidissement dans la glace, 1 µl de RNase H a été ajouté à chaque échantillon et le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant 20 min

afin d'éliminer la matrice d'ARN. L'ADNc est ensuite stocké à -20°C et servira de matrice pour la réaction de PCR.

II-2-3-6 Amplification par PCR et électrophorèse.

Des fragments cibles des ADNc précédemment obtenus par transcription reverse sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques résumées dans le Tableau IV-4.

Tableau IV-4 : Séquences des amorces du gène constitutif actine et celles du gène de sensibilité Os11N3

Gènes	Amorces	Séquences 5' → 3'	Tm °C
Actine	Sens	GTTACGTCGCGGCTGATTATG	51
	Anti-sens	TCGTGTTGGAGCATTTCCTTC	51
Os11g31190	Sens	GCTTCTCCGTCAGCGTCTTCGT	63
	Anti-sens	GCGGCCTTGTCGTCCTCCTCA	63

Pour chaque échantillon, 3 µl d'ADNc dilué (1/20) ont été utilisés dans un milieu réactionnel de 15 µl de volume final composé de 9,6 µl d'eau ; 1,80 µl de tampon 10X ; 0,3 µl de dNTP 10 mM ; 0,15 µl d'amorces (forward and reverse) 10 µM et 0,08 µl de taq 5U/µl. La PCR s'est déroulée en plusieurs phases à savoir une phase initiale de dénaturation à 94°C en 2min suivie de n cycles composés chacun d'une phase de dénaturation de 20 s à 94°C, une phase d'hybridation à 51°C ou 63°C selon les amorces pendant 20s et une phase d'extension de 72°C pendant 40 s ou 60 s. La réaction se termine par une extension finale à 72°C pendant 5min. Pour la PCR, un témoin négatif, l'eau et un témoin positif qui est de l'ADN génomique ont été utilisés. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2,5% et la révélation des profils électrophorétiques s'est faite à l'aide du bromure d'éthidium, BET.

III-Résultats

III-1 Dissection du QTL du chromosome 7

III-1-1 Héritéité du QTL

Deux cent trente six familles F₃ ont été développées à partir des pseudos F₁ obtenus par croisement de la lignée recombinante SSD90 avec le parent récurrent Azucena. Les cent individus F₂ et les soixante familles F₃ criblées à l'aide de la souche africaine MAI1, selon la méthode de Kauffman (Kauffman *et al.*, 1973) précédemment décrite dans le chapitre 2, ont montré une ségrégation récessive de la résistance.

III-1-2 Identification de marqueurs de résistance

In silico, un total de seize marqueurs polymorphes entre les parents IR64 et Azucena ont été identifiés dans la région RM125-RM214 (Tableau IV-5).

Tableau IV-5 : Liste des 16 marqueurs polymorphes in silico entre IR64 et Azucena

Chromosome	Marker	Start	End	Amplicon size	Nb hit in		State	
					Forward	Reverse		
7	RM21243	6833568	6833699	132 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21243	6940969	6941091	123 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21242	6766305	6766435	131 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21242	6837069	6837202	134 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21246	6895014	6895405	392 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21246	6994285	6994658	374 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21260	7270888	7270987	100 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21260	7341637	7341722	86 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21277	7684947	7685307	361 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21277	7716393	7716607	215 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21280	7710329	7710484	156 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21280	7742139	7742336	198 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21302	8412744	8413232	489 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21302	8463664	8464140	477 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21303	8436097	8436288	192 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21303	8487018	8487221	204 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21311	8661068	8661762	695 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21311	8727376	8728038	663 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21332	9074642	9074835	194 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21332	9092060	9092273	214 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21351	9980250	9980625	376 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21351	9823961	9824322	362 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21352	9987145	9987338	194 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21352	9830849	9831024	176 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21360	10158646	10158741	96 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21360	9965041	9965124	84 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21394	11035093	11035537	445 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21394	10754532	10754974	443 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21398	11363003	11363316	314 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21398	11070863	11071183	321 bp	1	1	OK	Indica
7	RM21421	12712017	12712189	173 bp	1	1	OK	Japonica
7	RM21421	11857067	11857217	151 bp	1	1	OK	Indica

Six parmi les seize marqueurs ont été réellement amplifiés par PCR. Le génotypage de 20 lignées SSD, sélectionnées au hasard, à l'aide de ces marqueurs suivi de la construction de mini carte génétique ont montré que tous ces marqueurs sauf RM125 appartiennent au même groupe de liaison (Tableau IV-6 & 7).

Tableau IV-6 : Liste des marqueurs de l'intervalle de confiance du QTL du chromosome 7 montrant le marqueur RM125 non assigné au même groupe de liaison que les autres.

Locus	Marker name	Sequence	Sequence name	Position
1	RM125	Unassigned		
2	RM21260	1	L_Group_1	1
3	RM21280	1	L_Group_1	2
4	RM21398	1	L_Group_1	3
5	RM21421	1	L_Group_1	4
6	RM214	1	L_Group_1	5

Tableau IV-7 : Table de LOD Score d'assignation des marqueurs aux groupes de liaison

	RM125	RM21260	RM21280	RM21398	RM21421
RM21260	0,00				
RM21280	0,00	3,74			
RM21398	0,00	3,47	4,82		
RM21421	0,00	4,02	5,72	5,12	
RM214	0,00	3,47	5,12	4,52	5,42

Le génotypage, à l'aide de ces cinq marqueurs, des soixante familles F_3 : SSD90 x Azucena, précédemment criblées avec la souche africaine MAI1, a permis de faire de nouvelles analyses de cartographie. Ces analyses ont montré que seul le marqueur RM214 reste associé au QTL du chromosome 7.

III-2 Analyse fine du QTL du chromosome 11

III-2-1 Validation de *Xa4* au locus du QTL

Le criblage de la population de cartographie constituée des 178 lignées recombinantes à l'aide de la souche asiatique PXO61, qui allume *Xa4* sur le chromosome 11, a mis en évidence le même QTL du chromosome 11 (LOD score de 36,78 et une R^2 égale 67,9%) (Figure IV- 1)

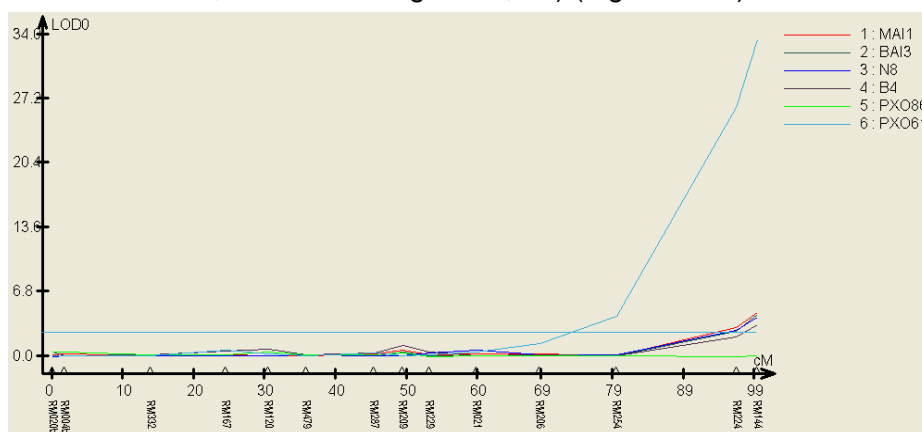


Figure IV- 1 : QTL mis en évidence avec la souche Xoo PXO61, parfaitement superposé à celui induit par les souches africaines

III-2-2 Hérité du QTL

Cent individus F_2 issus du croisement IR24 x IRBB4 ont été phénotypés à l'aide de la souche asiatique PXO61. Le ratio de ségrégation obtenu est de 3 Résistants : 1 Sensible qui correspond à la ségrégation d'un gène dominant dans une population F_2 . Il s'agit ici du gène *Xa4* allumé par la souche asiatique PXO61. Cent autres individus F_2 du même croisement ont été criblés à l'aide de la souche africaine de *Xoo* BAI3. La ségrégation obtenue dans ce cas est de 3 Sensibles : 1 Résistant. La souche africaine BAI3 allumerait donc un gène à hérité récessive différent de *Xa4* au locus du QTL du chromosome 11.

III-3 Cartographie du gène candidat au locus de ce QTL

III-3-1 Sélection de lignées recombinantes et taux de recombinaison

Le génotypage de cinq cent individus F_2 issus du croisement IR24 x IRBB4 à l'aide d'un marqueur de *Xa4* a mis en évidence cent vingt six individus homozygotes résistants *Xa4/Xa4*. Ceci représente le quart de la population total. Il s'agit donc de la ségrégation génotypique 1 :2 :1 attendue d'un caractère monogénique, contrôlé par un gène dominant, dans une population F_2 . Les 126 individus homozygotes *Xa4/Xa4* sont supposés résistants à la souche asiatique PXO61 qui allume *Xa4*. Semés et criblés en serre à l'aide de la souche africaine de *Xoo* BAI3, 10 individus des 126 sont sensibles et les 116 autres sont résistants. Ces 10 individus F_2 résistants à PXO61 et sensibles à BAI3 sont donc des recombinants. Le calcul du taux de recombinaison montre que le nouveau gène récessif serait situé à 3,98 cM du marqueur de *Xa4*.

III-3-2 Position du nouveau gène putatif *xa/B3* par rapport à *Xa4*

Dix familles F_3 sont obtenues par autofécondation des 10 individus recombinants F_2 . Du criblage de ces dix familles à l'aide des souches *Xoo* PXO61 et BAI3, il ressort que huit familles sont résistantes et deux ségrégent pour la maladie. Le gène allumé par BAI3 se trouve alors très lié à *Xa4* induit par la souche PXO61 (Tableau IV-8).

Tableau IV-8 : Carte génétique montrant la position du gène *xa/B3* par rapport à *Xa4*

Marker	Feature-type	Gramene annotated Nipponbare sequence 2006	Start RFLP Nip x Kas 2000	Stop RFLP Nip x Kas 2000	Start SSR (IR x Azu) RI map	Stot SSR (IR x Azu) RI map
Xa/B3 (5%)		25657231			86.37	86.37
S13316S	In silico map	26065501	111.5		88.13	88.13
G181=XNpb181	In silico map	26175423	112.1		88.60	88.60
xa/B3					88.87	88.87
Xa3	Interpolated from Nip x Kas RFLP map		109.8	144.4	89.44	93.90
Xa4	Interpolated from Nip x Kas RFLP map		110.4	113.8	90.02	93.32
L1044	In silico map	26518718	112.9		90.08	90.08
R251	In silico map	26609718	112.9		90.47	90.47
Xa/B3 (5%)					91.37	91.37
RXa26	Interpolated from Nip x Kas RFLP map		112.8	119.6	92.35	98.94
Xa22	Interpolated from Nip x Kas RFLP map		112.8	119.5	92.35	98.94
Rxa30	Interpolated from Nip x Kas RFLP map		112.9	117	92.44	96.42
E3191S	In silico map	27149510	115.1		92.80	92.80
Marker Xa4 Jap	In silico map	27166444			92.87	92.97
RM224	SSR framework marker	27375764			93.77	93.77
R1506	In silico map	27496808	116.2		94.17	94.17
xa/B3 (5%)					94.37	94.37
RM27318	URCM	27565072			94.40	94.40
RM27326	URCM	27681416			94.79	94.79
RM3577	URCM	27868383			95.41	95.41
C10150S	In silico map	28178005	117		96.44	96.44
RM144	SSR framework marker	28246911			96.67	96.67
Xa/B3					96.87	96.87
RZ536	In silico map	28375006	117.9		97.29	97.29
Xa/B3 (5%)					99.37	99.37

↑
Xa4
↓

III-4 Cinétique de croissance bactérienne

L'étude de la croissance bactérienne et de la vitesse de colonisation du xylème par les bactéries a montré que les deux souches PXO61 et BAI3 croissent de la même façon dans la variété de riz IR24 qui est sensible à la bactériose vasculaire. Cela se traduit par un nombre plus ou moins égal de colonies de PXO61 et de BAI3 détectées à chaque instant. C'est le cas au douzième jour après inoculation, où le nombre de colonies de PXO61 et de BAI3 est d'environ $\text{Log}_{10}(8)$ dans la fraction A, $\text{Log}_{10}(9)$ dans la fraction B. Ce nombre est passé à $\text{Log}_{10}(10)$ et $\text{Log}_{10}(10,5)$ respectivement dans les fractions C et D (Figure IV- 2). Par contre dans la lignée isogénique IRBB4 résistante, le nombre de colonies de ces deux souches est largement inférieur à ceux obtenus dans la variété IR24 (Figure IV 2 & 3). Dans ce cas, les deux souches croissent de façon inégale. Au douzième jour après inoculation, nous dénombrons $\text{Log}_{10}(8)$ de BAI3 et $\text{Log}_{10}(6)$ de PXO61 dans la fraction A, $\text{Log}_{10}(8)$ de BAI3 contre $\text{Log}_{10}(4)$ de PXO61 dans la fraction B. La souche asiatique PXO61 est ensuite bloquée au niveau de la fraction B

ce qui se traduit par l'absence de colonie dans les fractions C et D. Par contre, $\text{Log}_{10}(6)$ de colonies de la souche africaine BAI3 ont été mise en évidence dans les fractions C et D (Figure IV- 3).

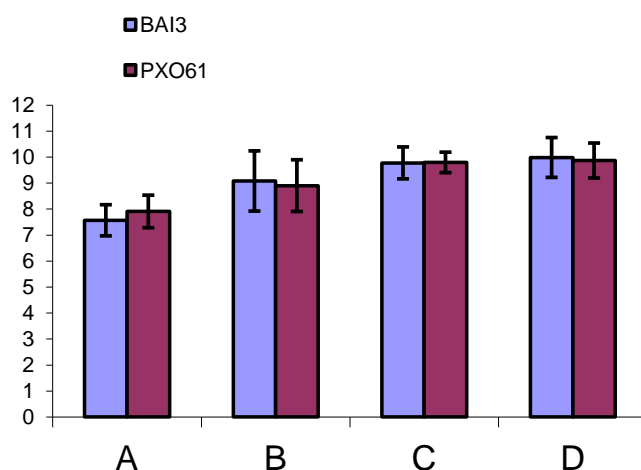


Figure IV- 2 : Croissance bactérienne douze jours après inoculation de la variété sensible IR24. A = 5 premiers centimètres de feuille à partir du point d'inoculation ; B = 2ème fraction de feuille de 5 cm ; C = 3ème fraction de feuille de 5 cm ; D = 4ème fraction de feuille de 5 cm

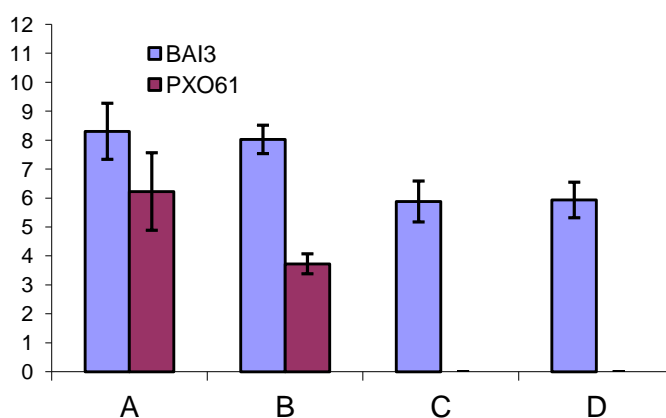


Figure IV- 3 : Croissance bactérienne douze jours après inoculation de la lignée isogénique résistante IRBB4. A = 5 premiers centimètres de feuille à partir du point d'inoculation ; B = 2ème fraction de feuille de 5 cm ; C = 3ème fraction de feuille de 5 cm ; D = 4ème fraction de feuille de 5 cm

III-5 Exploration de gènes de sensibilité : le cas d'OS11N3

La validation du gène a été réalisée par une approche de RT-PCR semi quantitative. Le travail de mise au point de la RT-PCR qui a consisté au calibrage du nombre de cycles minimal requis pour visualiser sur gel les amplicons lors de la phase linéaire d'amplification a montré que 30 cycles suffisent. Le profil d'expression de l'actine, un facteur de transcription utilisé comme marqueur d'une expression constitutive, est illustré par la figure IV- 4

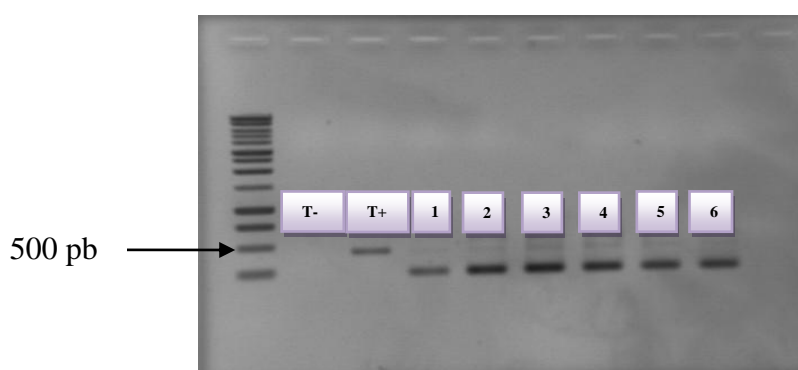


Figure IV- 4 : Expression constitutive de l'actine.

T- = sans ADN ; T+ = ADN génomique de Nipponbare ; 1 = IR24 inoculé avec de l'eau ; 2 = IR24 inoculé avec BAI3 ; 3 = IR24 inoculé avec PXO61 ; 4 = IRBB4 inoculé avec de l'eau ; 5 = IRBB4 inoculé avec BAI3 ; 6 = IRBB4 inoculé avec PXO61.

Aucun gène de sensibilité n'a été induit dans la lignée isogénique IRBB4. Par contre, aussi bien la souche africaine BAI3 que la souche asiatique PXO61 ont induit un gène de sensibilité dans la variété sensible IR24 (Figure IV- 5).

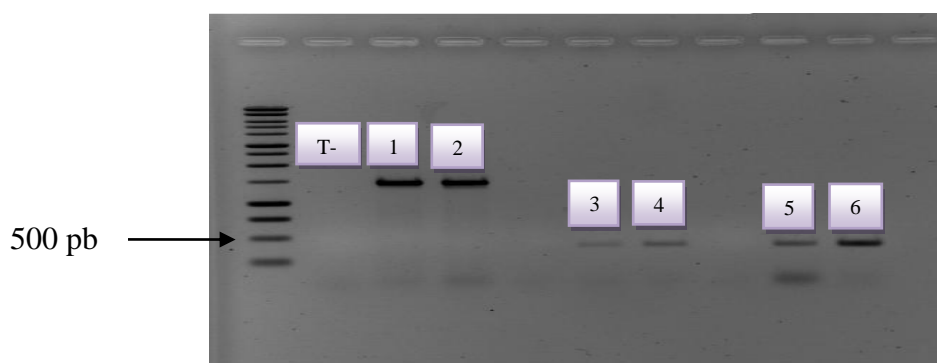


Figure IV- 5 : Expression induite du gène de sensibilité Os11N3.

T- = sans ADN ; 1 = ADN génomique de IR24 ; 2 = ADN génomique de IRBB4 ; 3 = IR24 inoculé avec PXO61 ; 4 = IR24 inoculé avec BAI3 (avec 3 et 4 obtenus après 28 cycles de PCR) ; 5 = IR24 inoculé avec PXO61 ; 6 = IR24 inoculé avec BAI3 (avec 5 et 6 obtenus après 30 cycles de PCR)

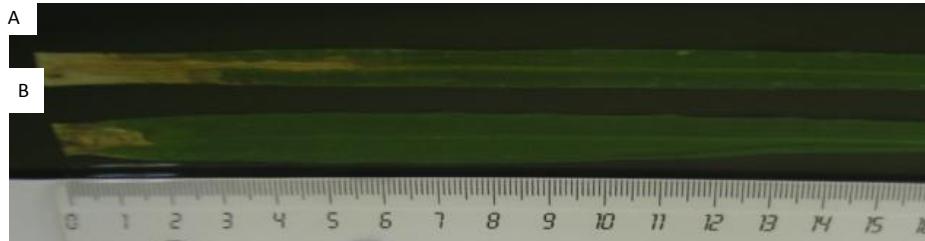


Figure IV- 6: Lésion provoquée par la souche africaine BAI3 (A) et la souche asiatique PXO61 (B) sur la lignée isogénique résistante IRBB4.

IV- Discussion

Dans ce chapitre, deux QTLs ont fait l'objet d'analyses fines. Le premier localisé sur le chromosome 7 et le second sur le chromosome 11. L'analyse de descendance a montré que ces deux QTLs de résistance aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ont une hérédité récessive. Les résultats partiels de cartographie de marqueurs indiquent que le marqueur microsatellite RM214 est associé au QTL du chromosome 7 alors que le gène récessif qui gouverne la résistance au locus du QTL du chromosome 11 est fortement associé au gène *Xa4* dont le marqueur est RM144. Les études de quantification et de la cinétique bactérienne dans la variété de riz sensible IR24 et sa lignée isogénique résistante IRBB4 ont confirmé la nature récessive du QTL du chromosome 11.

Contrairement à la grande majorité des gènes de résistance aux souches asiatiques de *Xoo* qui sont dominants (Lin *et al.*, 1996 ; Yoshimura *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 2002 ; Xiang *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2009 ; Natraj *et al.*, 2011), la résistance aux souches africaines apparaît récessive et indique un autre niveau de différence entre les souches africaines et asiatiques de *Xoo*. La recherche de marqueurs de résistance liés au QTL du chromosome 7 a montré que seul le marqueur RM214 lui reste associé. Les analyses de recombinaison révèlent que les cinq autres marqueurs polymorphes identifiés dans l'intervalle de confiance du QTL à savoir RM125, RM21260, RM21360, RM21398 et RM21421 forment un groupe de liaison indépendant. L'unique marqueur ancré, RM214, est cartographié à 18 cM de la résistance. De nouveaux marqueurs devront être criblés dans la région afin de réduire davantage l'intervalle de confiance. Plusieurs autres approches pourront être développées pour identifier le gène

impliqué. En effet, la banque de mutants IR64 peut être phénotypée avec l'une des souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ayant allumé le QTL du chromosome 7. Nous avons déjà phénotypé 500 mutants IR64 sans succès. IR64, le riz cultivé asiatique de la sous-espèce indica le plus largement cultivé en Asie du sud et du Sud-est, possède de nombreux caractères d'intérêt agronomique (large adaptabilité, potentiel élevé de rendement, tolérance aux maladies et aux parasites, et une bonne qualité culinaire) qui font de lui un génotype idéal pour identifier des mutations contrôlant des traits d'intérêt agronomique. Environ 60.000 mutants IR64 ont été produits (Wu *et al.*, 2005) par mutagenèse en utilisant des produits chimiques (diepoxybutane et ethylmethanesulfonate) et l'irradiation (neutron et rayon gamma). Ces mutants ont fait l'objet de plusieurs études dont celle de la base génétique de la tolérance du riz vis à vis du sel. L'analyse des mutants sensibles permettra donc d'identifier le gène impliqué.

La deuxième approche est une approche transcriptomique. En effet, des données de transcriptome IR64/MAI1 pourront être croisées avec celles de cibles de TALs pour identifier des candidats putatifs qui seront par la suite, validés. Cette validation pourra se faire soit par surexpression ou répression du gène cible grâce à des transformations génétiques stables ou RNAi (Waterhouse et Helliwell, 2003), soit par complémentation génétique d'un mutant (Doebley *et al.*, 1997).

La quantification bactérienne a révélé que les bactéries progressent à l'intérieur du xylème et vont au-delà de la limite des longueurs de lésion qu'elles induisent sur les feuilles de riz. Douze jours après inoculation, la lésion provoquée par la souche africaine BAI3 sur les feuilles d'IRBB4 est inférieure à 5 cm alors que des bactéries ont été mises en évidence dans les tissus foliaires à 20 cm du point d'inoculation. Les bactéries ne provoquent donc pas de lésion sur toute la longueur de feuille qu'elles colonisent. Ces bactéries perdent-elles leur virulence au fur et à mesure qu'elles progressent dans les vaisseaux du xylème ? Ou devront-elles atteindre un seuil de nombre de colonies avant de provoquer des symptômes ? Nous préconisons d'isoler des bactéries à différents endroits des feuilles infectées et de les réinoculer à des lignées isogéniques de riz porteuses de différents gènes *Xa* de résistance. La comparaison des différentes longueurs de lésions induites permettrait de mettre en évidence, éventuellement, la variation de la virulence bactérienne le long des feuilles infectées.

En général, les gènes récessifs ne forment pas des clusters avec d'autres gènes de résistance (Ronald, 1998) et ne colocalisent pas avec des gènes analogues comme c'est le cas des gènes dominants (Wang *et al.*, 2001). Mais contrairement à ce que disent ces auteurs, le gène récessif au locus du QTL du chromosome 11, *xa/B3*, est localisé au niveau d'un cluster de gènes dominants. Ceci atteste de la singularité de ce gène. La cartographie génétique le projette à 4 centiMorgans du marqueur de *Xa4* mais ne précise pas s'il est situé en amont ou en aval de ce marqueur. Les résultats

de l'étude de descendance sur les dix familles recombinantes F₃ apportent plus de précision. En effet, la coségrégation phénotypique de la résistance aux deux souches BAI3 et PXO61 montre que les gènes induits par ces deux souches bactériennes sont liés ou alors, ces deux souches induisent différents allèles d'un même gène. Mais les résultats de la quantification et de la cinétique bactérienne montrent clairement que le mécanisme d'action de la souche africaine BAI3 est bien différent de celui de la souche asiatique PXO61 qui allume un gène dominant qui est le gène *Xa4*. En effet, dans la lignée isogénique IRBB4 résistante aux deux souches, la lésion induite par BAI3 est trois fois plus grande que celle induite par PXO61 (Figure IV- 6). *Xa4*, empêche la multiplication et la progression de la bactérie PXO61 dans les tissus foliaires qui se traduit, d'une part, par un nombre réduit de PXO61 dans ces tissus et, d'autre part, par l'absence totale de cette bactérie au-delà de 10 cm du point d'inoculation. Ceci est en conformité avec le mode d'action des gènes de résistance à hérédité dominante. Par contre, des colonies de la souche africaine BAI3 ont été mises en évidence même à 20 cm du point d'inoculation. Cette souche parvient donc à se multiplier et à coloniser les tissus vasculaires induisant un phénotype moins nettement résistant (Figure IV- 6). Elle induirait donc un gène récessif. Ce gène induit par la souche africaine BAI3 serait une cible de TAL et donc pourrait être considéré comme un gène de sensibilité (S) requis pour le développement de la maladie. A ce jour, seuls deux gènes de sensibilité à *Xoo* ont été identifiés. Il s'agit d'*OsTFX1*, codant pour un facteur de transcription et *Os11N3* ou encore *OsSWEET14* codant pour une protéine de la famille des nodulines N3. Ces gènes sont respectivement induits par les effecteurs *PthXo6* et *PthXo1* (Chu *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2006; Sugio *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009). Les résultats de RT-PCR semi quantitative ont montré que la souche africaine de *Xoo* BAI3 induit le gène de sensibilité *Os11N3* dans la variété sensible de riz IR24. C'est donc la non-expression de ce gène dans la lignée isogénique IRBB4 qui conduit à la résistance de cette lignée. De ces résultats, il ressort aussi que la souche asiatique PXO61 qui allume le gène dominant *Xa4*, induit lui aussi l'expression du gène de sensibilité *Os11N3* dans IR24. La résistance d'IRBB4 (porteuse de *Xa4*) à la souche asiatique PXO61 résulterait non seulement de l'induction du gène dominant de résistance *Xa4*, mais aussi de la non-expression du gène de sensibilité. Ceci met en évidence un nouveau mécanisme complexe de résistance qui mérite d'être mieux caractérisé.

Les différents gènes récessifs de résistance aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* devront être clonés car le récent clonage de certains gènes d'intérêt agronomique a facilité le développement de marqueurs fonctionnels. Il s'agit des marqueurs définis à l'intérieur du gène cible lui-même et qui sont utilisés avec grande précision et efficacité pour identifier des allèles favorables dans un programme de sélection. C'est le cas d'un ensemble de marqueurs fonctionnels de *xa5* appelés « CAPS markers » (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Iyer et McCouch,

2007). La sélection à base de ce type de marqueur est de loin plus efficace et plus précise que la sélection assistée par marqueur qui utilise des marqueurs flanquants indirectement liés au gène cible. Suite à une recombinaison, ces marqueurs flanquants peuvent ségréger séparément du gène d'intérêt. Une meilleure caractérisation de ces gènes permettra de définir des stratégies efficaces de lutte contre la bactériose en Afrique.

Conclusion

L'étude de l'hérédité des deux plus importants QTLs induits par les souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sur les chromosomes 7 et 11 a révélé que ces deux QTLs ségrégent de façon récessive. Par contre, la plupart des gènes de résistance efficaces contre les souches asiatiques de *Xoo* ont une hérédité dominante. Le marqueur moléculaire de type microsatellite RM214 semble associé à la résistance contrôlée par le QTL du chromosome 7 mais se trouve encore éloigné de ce dernier. Le QTL du chromosome 11 est gouverné par un nouveau gène récessif spécifique aux souches africaines de *Xoo*, gène dont l'expression serait influencée par un autre gène asiatique Xa4 auquel il est étroitement lié.

Chapitre V

Discussion générale

I- Les principaux résultats obtenus

Le principal objectif de cette thèse était d'étudier le déterminisme génétique de la résistance du riz aux souches Africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, l'agent pathogène de la bactériose vasculaire du riz. Pour atteindre cet objectif, nous avons, dans un premier temps, recherché des sources de résistance naturelle dans un core collection de *O. glaberrima*, puis caractérisé cette résistance par une analyse de cartographie fine de QTLs. La recherche de sources de résistance naturelle a consisté à cribler une centaine d'accessions de riz cultivé Africain *Oryza glaberrima*, en collection au centre du riz pour l'Afrique, ainsi que quelques accessions de riz *Oryza sativa* pour la résistance aux souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Nous avons pu identifier des accessions de *O. glaberrima* ainsi que de *O. sativa* résistantes aux souches de *Xoo* provenant notamment du Mali. La plupart des accessions d'*O. glaberrima* sont sensibles aux souches *Xoo* du Burkina-Faso. Certaines accessions d'*O. glaberrima* présentent une résistance élevée aux souches *Xoo* des Philippines. Parmi les accessions que nous avons criblées nous avons identifié une très bonne source de résistance aux différentes souches africaines de *Xoo* chez *O. sativa indica* IR64. A l'opposé *O. sativa* subsp *japonica* Azucena est très sensible. Ces résultats nous ont conduits à examiner le déterminisme génétique de la résistance en analysant la population de référence IR64 x Azucena. Celle-ci est constituée de lignées recombinantes issues du croisement entre IR64 et Azucena et a été utilisée ici pour cartographier les QTLs de résistance à la bactériose. L'étude de ségrégation de cette population pour la maladie a montré qu'il s'agit d'une résistance polygénique gouvernée par différents QTLs. Les souches Africaines de *Xoo* BAI3, BAI4, MAI1 et NAI8 induisent des QTLs de résistance différents de ceux induits par les souches Asiatiques PXO61 et PXO86 excepté celui situé sur le chromosome 11. En effet ces souches Africaines de *Xoo* induisent ou allument cinq QTLs respectivement sur les chromosomes 1, 7, 9, 10 et 11. Les QTLs correspondant aux souches Asiatiques sus-citées sont localisés sur les chromosomes 4, 5, 8, 11 et 12. Alors que l'allèle donneur de résistance aux souches Africaines de *Xoo* provient du parent indica IR64, la résistance aux souches Asiatiques est contrôlée par l'allèle Azucena, le parent japonica. Nous avons également répertorié tous les gènes et QTLs de résistance déjà identifiés contre les souches Asiatiques. Cette étude a montré l'existence de 35 gènes et de 17 QTLs que nous avons recartographiés sur la carte de référence IR64 x Azucena. Plusieurs co-localisations de gènes de résistance communs aux souches Africaines et Asiatiques ont été mises en évidence. A l'opposé, des gènes spécifiques aux souches *Xoo* d'Afrique ou d'Asie ont été identifiés. Enfin, à cause de l'intérêt qu'ils représentent, deux des QTLs de résistance aux souches Africaines ont été finement analysés : il s'agit du QTL du chromosome 7 qui contrôle 37% de la variance phénotypique, et celui localisé sur le chromosome 11 qui est impliqué dans la résistance à toutes

les souches Africaines de *Xoo* testées. L'étude de ségrégation de ces QTLs a montré qu'il s'agit dans les deux cas d'une hérédité récessive. La recherche de marqueurs de résistance a montré que le QTL du chromosome 7 allumé par les souches *Xoo* africaines MAI et BAI4 est associé au marqueur microsatellite RM214 qui reste, tout de même, cartographié à 18 cM de ce QTL. Par contre, le marqueur associé au QTL du chromosome 11 induit par toutes les souches africaines de *Xoo* est lié au gène dominant *Xa4*, efficace contre des souches *Xoo* asiatiques notamment PXO61. L'étude de croissance et de la cinétique bactériennes dans la lignée isogénique résistante IRBB4 (porteuse de *Xa4*) du riz révèle que le mécanisme d'action de la souche africaine BAI3 est différent de celui de la souche asiatique PXO61 qui induit un gène dominant *Xa4*.

II- Le choix d'*Oryza glaberrima* pour la recherche de source de résistance

Oryza glaberrima (2n = 24, AA) est l'espèce Africaine de riz cultivé qui a été domestiquée en Afrique de l'Ouest depuis environ 1500 ans dans la vallée du delta de Niger à partir de son ancêtre sauvage *O. barthii* (syn. *O. breviligulata*). Il présente une diversité génétique très faible comparée à celle du riz asiatique *O. sativa* (Oka *et al.*, 1958; Second, 1982). Toutefois, et pour des raisons non seulement sociologiques mais aussi agronomiques et économiques, la production d'*O. glaberrima* reste marginale dans certaines régions comme au Burkina, en Guinée, au Mali et au Niger. En effet, après l'introduction du riz asiatique *O. sativa* en Afrique de l'Est et en Afrique de l'Ouest respectivement au 10^{ème} et 16^{ème} siècle par les commerçants arabes et les navigateurs portugais, hollandais, britanniques et français (Portères, 1950), le riz africain *O. glaberrima* a été progressivement abandonné en raison de son faible potentiel de production dû essentiellement à une grande sensibilité à la verse et à son égrenage spontané. De plus, le potentiel de rendement d'*O. glaberrima* est très faible par rapport à celui de *O. sativa* en condition irriguée (Jones *et al.*, 1997). Ses grains sont cependant encore utilisés dans des cérémonies rituelles ou consommés pendant les périodes des travaux champêtres. Il est aussi adapté à des modes particuliers de culture comme la riziculture de type flottant (Linares, 2002). *O. glaberrima* possède plusieurs caractères d'intérêts tels que la compétitivité aux mauvaises herbes (Moukoubi *et al.*, 2011 in press), la tolérance à la sécheresse (Maji *et al.*, 2001), à la submersion, à l'acidité et la salinité du sol (Sarla and Swamy, 2005), à la toxicité ferreuse (Sahrawat *et al.*, 2002) et alumineuse (Baggie *et al.*, 2002). Il constitue aussi une source de résistance à plusieurs maladies au nombre desquelles la panachure jaune du riz (Ndjiondjop *et al.*, 1999 ; Albar *et al.*, 2006; Thiémélé *et al.*, 2010), la pyriculariose (Silué *et al.*, 1991), les nématodes (PlowRight *et al.*, 1999 ; Lorieux *et al.*, 2003), les

insectes foreurs de tige et la cécidomyie africaine (Williams *et al.*, 1999 ; Nwilene *et al.*, 2002). *O. glaberrima* représente donc un riche réservoir de gènes d'intérêt et constitue ainsi un matériel de choix pour la recherche de gènes de résistance à la bactériose. Il a déjà fait l'objet de différents programmes visant à valoriser son contenu en gènes. *O. glaberrima* a été utilisé par le centre du riz pour l'Afrique (AfricaRice) pour développer les variétés interspécifiques de riz "NERICA" (New Rice for Africa) qui combinent à la fois la rusticité de l'espèce *O. glaberrima* et la productivité du riz asiatique *O. sativa* (Jones *et al.*, 1997). En effet, durant le stade végétatif ces NERICA émettent des feuilles larges et retombantes leur conférant une compétitivité aux adventices. Ils développent de nombreuses talles portant des panicules très longues capables de produire plus de 400 grains. Avec un cycle de développement de 90 à 100 jours, les NERICA ont un rendement pouvant atteindre 6t/ha dans les meilleures conditions (Ikeda *et al.*, 2007).

L'introgession de gènes d'intérêt de l'espèce *O. glaberrima* dans l'espèce *O. sativa* reste cependant difficile à cause de la barrière reproductive entre ces deux espèces qui se traduit par la stérilité mâle et femelle très élevée dans les générations de backcross. Cette stérilité constitue donc une contrainte majeure à l'exploitation des gènes de l'espèce *O. glaberrima* dans des programmes d'amélioration variétale. Plusieurs loci de stérilité ont été identifiés notamment le locus S1 sur le chromosome 6 (Sano *et al.*, 1990), S18 sur le chromosome 10, S20 et S21 sur le chromosome 7, S33 (t) sur le chromosome 1 (Ren *et al.*, 2005), S29 (t) sur le chromosome 2 (Hu *et al.*, 2006), S19 et S34 (t) sur le chromosome 3 (Taguchi *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.* 2006). Plusieurs études de caractérisation du locus S1 ont été faites et ont conduit à une carte physique de la zone de ce locus avec une région candidate de 300 kb (Koide *et al.*, 2008 ; Garavito-Espejo *et al.*, 2009). Des marqueurs moléculaires de ce locus ont été développés. Ces marqueurs ont été utilisés dans le cadre du projet ibridge de « Generation Challenge Program » pour contre-sélectionner le locus S1, caractériser et introgresser divers caractères intéressants du riz cultivé d'Afrique *O. glaberrima* dans l'espèce asiatique *O. sativa*. Ainsi différentes populations de lignées d'introgession interspécifiques (*O. sativa* x *O. glaberrima*) ont été développées. Certaines ont été utilisées pour construire une librairie de CSSL (ou lignées de substitution de segments chromosomiques) qui représentent le génome entier du parent donneur dans le fond génétique du parent récurrent. Ceci constitue une avancée notoire dans l'exploitation du réservoir de gènes que constitue le riz cultivé africain *O. glaberrima* car plusieurs de ses gènes d'intérêt restent encore non exploités.

III- *Oryza glaberrima*, une source de résistance à la bactériose?

Le criblage du riz cultivé Africain *Oryza glaberrima* a montré que pour certaines accessions, cette espèce présente une source de résistance à certaines souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* d'origine africaine, notamment celle de la race A3 du Mali alors que par ailleurs, *O. glaberrima* est sensible à quasiment toutes les souches du Burkina-Faso. Cela montre l'existence d'interactions spécifiques entre les variétés de riz et les souches de *Xoo*. Une bonne connaissance de ces interactions permettra de mieux définir les stratégies de lutte contre la maladie. En effet, les TALs (transcription activator-like) jouent un rôle fondamental lors des interactions riz-*Xanthomonas*. Ce sont des protéines bactériennes injectées dans la cellule hôte à travers un système de sécrétion en forme de seringue appelé système de sécrétion de type III. Ces TALs dont le domaine central est constitué d'une répétition de 25 à 34 acides aminés pénètrent dans le noyau de la cellule végétale hôte, et se fixent à un domaine ciblé sur l'ADN des cellules de plante hôte (Boch et Bonas 2010). Le domaine ciblé correspond au promoteur du gène de sensibilité de la plante hôte. Ces TALs activent donc la transcription des gènes de sensibilité, ce qui permet à la bactérie de croître et d'envahir la cellule hôte, provoquant ainsi la maladie (Boch et Bonas, 2010, Bogdanove *et al.*, 2010). Les TALs sont donc des facteurs de virulence très importants dans l'interaction riz-*Xanthomonas* (Bai *et al.*, 2000; White et Yang, 2009). Lors des interactions riz-*Xanthomonas*, ces TALs permettent aussi à la bactérie d'accéder aux ressources nutritionnelles du riz (Chen *et al.*, 2010). Une mutation dans un des TAL (talC) de la souche africaine *Xoo* BAI3 affecte la capacité de la bactérie à provoquer la maladie. L'absence de la capacité du mutant BAI3 talC à induire des symptômes dans la plante confirme le rôle majeur de virulence de ce TAL au cours de la colonisation du tissu vasculaire de riz (Yu *et al.*, 2011). Plus récemment, Pesce *et al.* 2011 a montré le rôle d'un autre Tal (tal5) de la souche Africaine *Xoo* MAI1 comme effecteur majeur de virulence et sa capacité à induire le gène de sensibilité Os11N3.

L'équipe de Yang et celle de Chu en 2006 ont établi un nouveau concept selon lequel, c'est la non-induction d'un allèle de sensibilité qui est la source de résistance à la bactériose vasculaire (Yang *et al.*, 2006 ; Chu *et al.*, 2006). En effet, ces auteurs ont caractérisé le gène récessif de résistance xa13 (ou encore appelé Os8N3 ou OsSWEET11). Ce dernier ne diffère de l'allèle dominant Xa13 qu'au niveau de sa séquence promotrice et il est le seul à être induit au cours de l'infection par la bactérie. Récemment, le code de reconnaissance de la séquence promotrice du gène de sensibilité par les TALs a été déchiffré (Boch *et al.*, 2009 ; Moscou et Bogdanove, 2009). Ces auteurs ont montré que la spécificité de la fixation des TALs est gouvernée par des résidus variables répétés, RVDs (repeat-variable diresidues) en position 12 et 13 dans chaque module de séquences d'acides aminés répétés du domaine central des TALs. Les différents RVDs reconnaissent alors différentes paires de bases de la

séquence promotrice du gène de sensibilité (Boch *et al.*, 2009 ; Moscou et Bogdanove, 2009). Cette nouvelle découverte ouvre donc la voie à de nombreuses applications biotechnologiques (Bodganove *et al.*, 2010; Christian *et al.*, 2010; Morbitzer *et al.*, 2010 ; Romer *et al.*, 2010 ; Scholze et Boch 2011). Ce code a été utilisé pour prédire la boîte de fixation ciblée par des TALs dans le promoteur de gènes de riz. Il a également permis de générer la structure des TALs qui activent la transcription de gènes cibles définis. De nouvelles stratégies de sélection assistée par marqueurs peuvent donc être développées pour identifier des variants alléliques du promoteur des gènes de sensibilité comme nouvelles sources de résistance. Les accessions de *Oryza glaberrima* identifiées comme sensibles à la bactériose, au cours de cette thèse, pourront être utilisées à cette fin. Le séquençage de génome de *O. glaberrima* en vue de mettre en évidence des sites de fixation de TALs permettra d'identifier aussi bien des gènes de sensibilité que des gènes de résistance. Le génome de riz pourrait être muté en vue de créer plusieurs sites de fixation de différents TALs. Ce serait une nouvelle et rapide approche pour le développement d'une résistance durable de large spectre d'action (Verdier *et al.*, 2011).

Au cours de cette thèse, l'évaluation du riz Africain *O. glaberrima* a révélé que certaines accessions sont résistantes à la fois à MAI1 d'origine africaine et PXO86 d'Asie bien que les souches Asiatiques et Africaines de *Xoo* soient génétiquement distinctes (Gonzalez *et al.*, 2007). Elles se distinguent au niveau de la structure de leurs génomes. En effet, l'analyse comparée de ces deux génomes de *Xoo* par la technique SSH « Suppression-Subtractive Hybridization » (Soto-Suarez *et al.*, 2010) a révélé des séquences non redondantes qui sont spécifiques aux souches Africaines de *Xoo*. La plupart de ces séquences codent pour des protéines de fonctions inconnues.

La présente thèse a également montré que les résistances identifiées chez le riz Africain *O. glaberrima* n'est gouvernée ni par *xa5*, ni par *Xa21* (Djedatin *et al.*, 2011), deux gènes de résistance aux souches Asiatiques de *Xoo* qui sont largement utilisés dans des programmes d'amélioration en Asie (Sundaram *et al.*, 2009 ; Shanti *et al.*, 2010). Il serait indiqué d'explorer davantage de gènes de résistance déjà connus surtout le *Xa7* qui confère la résistance la plus durable à la bactériose vasculaire en Asie (Vera Cruz *et al.*, 2000). Parmi les 35 gènes *Xa* connus, 4 ont été identifiés chez des espèces sauvages de riz. Il s'agit de *Xa21* (Khush *et al.*, 1990), *Xa23* (Zhang *et al.*, 1998), *Xa27* (Gu *et al.*, 2004), *Xa30(t)* (Cheema *et al.*, 2008) respectivement chez *Oryza longistaminata*, *O. rufipogon*, *O. minuta* et *O. nivara*. Il est donc urgent de rechercher de nouvelles sources de résistance aux souches africaines de *Xoo* chez les espèces sauvages de riz. Certaines accessions d'*O. glaberrima* sensibles aux souches africaines de *Xoo* telle que TOG5307 (Djedatin *et al.*, 2011) sont résistantes à la panachure jaune du riz (Thiémélé *et al.*, 2010). Ces types d'accessions pourront être croisés avec des variétés résistantes à la bactériose en vue de pyramider des gènes de résistance à ces deux maladies.

IV- Identification de QTLs/gènes de résistance à la bactériose

IV-1 L'importance du matériel génétique utilisé dans la cartographie de QTLs

Le type de matériel génétique est un facteur déterminant dans la cartographie de QTL. Le développement d'une population de cartographie nécessite deux parents génétiquement distincts pour le caractère à cartographier. Cela permet de créer du polymorphisme. Mais en même temps, les parents de croisement ne doivent pas être génétiquement trop éloignés l'un de l'autre afin d'éviter la stérilité reproductive des descendants qui se traduit par un taux élevé de distorsion de ségrégation lors des analyses de liaison (Semagn *et al.*, 2006b). Le criblage du riz africain *O. glaberrima* à l'aide des souches africaines de Xoo a montré qu'il constitue une source de résistance très étroite à la bactériose vasculaire. Par contre IR64, la variété du riz asiatique de la sous-espèce indica, s'est révélée résistante à toutes les souches africaines de Xoo testées alors qu'Azucena, une variété de la sous-espèce japonica est très sensible. Ces deux variétés d'*Oryza sativa* présentent donc des phénotypes contrastés pour la résistance à la bactériose. La population de référence constituée de 178 lignées recombinantes obtenues par croisement de la variété résistante IR64, par la variété Azucena a été utilisée. Cette population a déjà servi dans plusieurs études génétiques notamment de cartographie de gènes et QTLs de résistance à la sécheresse, à la toxicité ferreuse, au virus de la panachure jaune du riz. La puissance de détection et la précision de la position des QTLs dépendent étroitement du taux de recombinaison au sein de la population de cartographie. Plus ce taux est élevé, plus précise sera la position des QTLs détectés. A ce titre, la population de lignées recombinantes (IR64 x Azucena) utilisée est bien adaptée à cette étude car elle offre plus d'évènements de recombinaison que tout autre type de population de cartographie.

IV-2 Les différentes méthodes d'analyse influencent-elles les résultats ?

Les méthodes utilisées pour détecter des QTLs sont aussi bien nombreuses que variées. Elles vont des plus simples au plus complexes. La plus simple est « l'analyse simple marqueur » qui se fait par une analyse de variance (ANOVA). Elle est applicable à de nombreux loci mais ne permet ni de positionner le QTL entre les marqueurs, ni de calculer son effet réel sur le caractère, ce qui est possible par la cartographie d'intervalle simple (Single Interval mapping). Cependant, elle présente l'avantage de mettre en évidence tous les QTLs y compris ceux ayant des effets mineurs. La fiabilité de la cartographie d'intervalle est examinée en utilisant le LOD score, qui explique la probabilité de présence d'un QTL par

rapport à la probabilité d'absence de ce QTL en une position donnée du génome. Ce LOD score est en général de l'ordre de 2,5 à 3 (Wang *et al.*, 2006). Nous avons décidé de retenir les QTLs au seuil LOD >3. Autrement dit, un QTL n'est retenu que lorsque la probabilité de sa présence est plus de 1000 fois plus grande que celle de son absence. Une autre méthode classique d'analyse plus pointue de QTL est la cartographie d'intervalles multiples (inclusive composite interval mapping) qui présente l'avantage de pouvoir détecter plusieurs QTL sur un même groupe de liaison ce qui n'est pas possible avec le « Single interval mapping ». Ces différentes méthodes ont été utilisées dans cette étude dont les résultats varient selon qu'il s'agisse d'analyse simple ou d'analyse multiple. En effet, l'analyse de variance ANOVA a révélé une quinzaine de QTLs induits par les souches africaines de *Xoo* alors que le «Single interval mapping » et le «Inclusive composite interval mapping» n'en ont révélé que cinq parmi les 15 précédemment identifiés. Ces cinq QTLs sont les mêmes pour les deux méthodes mais la puissance de détection de la deuxième méthode, qui se traduit par des valeurs plus grandes des LOD score, est plus élevée que celle de la première. Il apparaît donc que la puissance de détection et la précision de la position d'un QTL dépendent de la méthode d'analyse utilisée dont la plus complexe et la plus robuste reste la cartographie d'intervalle appelée «Inclusive composite interval mapping».

IV-3 Caractérisation de la résistance du riz asiatique *O. sativa* à la bactériose en Afrique.

La résistance du riz asiatique *O. sativa* aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* est gouvernée par plusieurs QTLs cartographiés sur différents chromosomes du riz. Les allèles donneurs de la résistance proviennent de la variété IR64 de la sous-espèce indica. Cette sous-espèce constitue donc une bonne base génétique de la résistance aux *Xoo* d'Afrique contrairement au riz cultivé africain *O. glaberrima* qui n'offre qu'une base génétique très étroite à la résistance au BB (Djedatin *et al.*, 2011). D'une manière générale, la sous-espèce indica du riz cultivé asiatique *O. sativa* constitue une bonne source de résistance au BB aussi bien en Asie qu'en Afrique. En effet, quatorze des dix sept QTLs identifiés contre les souches Asiatiques de *Xoo* sont gouvernés par des allèles de IR64 et Teqing qui sont toutes deux des variétés de la sous-espèce indica (Djedatin *et al.*, submitted). Ces résultats sont en accord avec ceux de Verdier qui montrent que la race africaine A1 de *Xoo* induit de la résistance sur les *indica* (Données non publiées). Il en est de même de la plupart des gènes majeurs de résistance identifiés contre les souches asiatiques de *Xoo*. En effet, douze ont été identifiés et cartographiés dans des variétés indica, trois dans japonica et sept chez des types sauvages (Djedatin *et al.*, submitted). Deux des QTLs identifiés contre les souches africaines de *Xoo* respectivement sur le chromosome 7 et le chromosome 11 ont fait l'objet

d'une étude fine. Cette étude a montré que les deux QTLs ségrégent de façon récessive contrairement à l'hérédité dominante de la grande majorité des gènes majeurs de résistance aux souches asiatiques de *Xoo*. En effet, seuls treize des trente cinq gènes de résistance caractérisés jusqu'à présent (*xa5*, *xa8*, *xa13*, *xa15*, *xa19*, *xa20*, *xa24*, *xa25*, *xa26*, *xa28*, *xa31(t)*, *xa33(t)* et *xa34*) sont récessifs (Wu *et al.*, 2008; Ruan *et al.*, 2008; Korinsak *et al.*, 2009). Le riz cultivé asiatique *O. sativa* présente donc une résistance récessive aux souches Africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

V- Les gènes de résistance aux souches asiatiques de *Xoo* peuvent-ils être efficaces dans la riziculture en Afrique?

A ce jour, aucun gène de résistance spécifique aux souches africaines de *Xoo* n'a été encore identifié. La cartographie fine des QTLs de résistance aux souches africaines identifiés dans la présente étude, est en cours. Cependant, le déploiement dans la riziculture africaine des gènes de résistance aux souches asiatiques déjà clonés ou cartographiés est envisageable. Pour ce faire, tous les gènes et QTLs de résistance aux souches Asiatiques de *Xoo* ont été répertoriés de même que leurs positions génétiques et physiques. Les différentes populations et cartes génétiques ayant servi à les cartographier ont été également prises en compte. En utilisant les marqueurs colocalisants et/ou marqueurs flanquants, la position génétique de chaque gène ou QTL a été interpolée de la carte originelle sur la carte IR64 x Azucena qui a servi à cartographier les QTLs de résistance aux souches Africaines de *Xoo*. La position physique des gènes finement cartographiés a été directement reportée sur la carte IR64 x Azucena.

Les résultats de l'interpolation montrent que certains gènes et QTLs de résistance aux souches asiatiques de *Xoo* pourraient être utilisés dans la riziculture africaine pour lutter contre la bactériose. C'est le cas des gènes de résistance récessive *xa34(t)* efficace contre les souches chinoises de *Xoo* appartenant à la race V qui colocalise avec qMAI1, le QTL de résistance induit par la souche Africaine MAI1 sur le chromosome 1 et *xa8* induit lui aussi par des souches Asiatiques de *Xoo* et qui chevauche avec qBM induit par des souches Africaines de *Xoo* appartenant aux races A1 et A2 sur le chromosome 7. Ce travail d'interpolation des gènes Xa connus sur la carte IR64 x Azucena apporte donc une expertise avérée en particulier sur la position exacte des différents gènes Xa et QTLs de résistance à la bactériose vasculaire du riz et donne une idée des gènes de résistance asiatiques qui pourraient être utilisés contre des souches africaines de *Xoo*.

VI- Déploiement de gènes de résistance au BB dans la riziculture africaine.

Le moyen de lutte le plus efficace contre la bactériose reste le développement de variétés résistantes par la sélection assistée par marqueurs ou la sélection récurrente assistée par marqueurs. Ces variétés porteuses de gènes de résistance seront déployées ensuite dans la riziculture. Avant tout déploiement de gène, il est indispensable de connaître d'abord sa durabilité qui est influencée par la structure des populations de pathogènes. En effet, l'efficacité d'un gène de résistance dépend de la prévalence, dans le temps et dans l'espace, des différentes races de pathogènes ciblées par ce gène et de leur aptitude à surmonter le ou les gènes déployés. Le pyramidage de plusieurs gènes dans une variété élite offre une résistance beaucoup plus durable. C'est le cas des variétés pour lesquelles les gènes Xa7 et Xa21 (Zhang *et al.*, 2006), xa5, xa13 et Xa21 (Sundaram *et al.*, 2009), Xa4, xa5, xa13 et Xa21 (Shanti *et al.*, 2010) ont été pyramidés et déployés en Asie. En effet, déployés individuellement dans des variétés sensibles, les gènes de résistance ont une durabilité courte. C'est le cas, entre autre, des gènes Xa4, xa5, xa13 et Xa21 qui, déployés individuellement dans la riziculture en Asie, n'ont conféré la résistance que pendant seulement six saisons culturales (Vera Cruz *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2010). Une attention particulière doit être accordée à l'effet des changements climatiques qui, non seulement affectent directement la production rizicole (Muller *et al.*, 2011) mais aussi, influencerait la durabilité des gènes de résistance. Une forte température combinée à une humidité élevée favorise le développement de la bactériose qui devient particulièrement sévère pendant les saisons chaudes (Horino *et al.*, 1982). Récemment, il a été démontré que la plupart des gènes de résistance excepté Xa7, perdent leur efficacité à une température élevée (Webb *et al.*, 2010). En effet, une forte température accélérerait, dans plusieurs pathosystèmes, le contournement des gènes de résistance de la plante par augmentation de la pression de la maladie et/ou l'altération de l'efficacité du gène de résistance (Coakley *et al.*, 1999 ; Garrett *et al.*, 2006). Les fortes températures impactent négativement le rendement de riz en Asie (Peng *et al.*, 2004 ; Welch *et al.*, 2010). Les changements climatiques observés pourraient également affecter la dynamique et la distribution des souches de Xoo. Pour être efficace, tout programme de déploiement de gènes de résistance vis-à-vis de la bactériose à Xoo en Afrique, devra tenir compte du contexte global de changement climatique (Verdier *et al.*, 2011).

A ce jour, il n'existe aucun gène de résistance spécifique aux souches africaines de Xoo. Des travaux préliminaires ont montré que les gènes majeurs de résistance Xa4, xa5 et Xa7 aux souches asiatiques de Xoo confèrent également une résistance élevée aux souches africaines

(Gonzalez *et al.*, 2007; Djedatin *et al.*, unpublished data). Les présents travaux de thèse ont permis pour la première fois, d'identifier des QTLs de résistance spécifiques aux souches africaines de *Xoo* et de valider l'efficacité de *xa5* contre les souches africaines de la race A1 par marqueurs et par étude de ségrégation. Ces gènes *Xa4*, *xa5* et *Xa7* pourront donc être utilisés dans la riziculture africaine en attendant l'achèvement de la cartographie fine des QTLs de résistance spécifiques aux souches africaines (Djedatin *et al.*, submitted). Le criblage des quelques accessions de *O. glaberrima* résistantes à MAI1 à l'aide des marqueurs CAPS (Cleaved Amplified Polimorphism Sequence) et la technique de Dot blot a montré qu'aucune de ces accessions ne porte les allèles *xa5* et *Xa21*. Elles possèderaient donc de nouveaux gènes de résistance qui seront cartographiés et déployés dans la riziculture africaine. Certains *glaberrima* résistants (TOG5314, TOG5803, TOG6202, TOG6206, TOG6238, TOG6356, TOG6710, TOG6767, TOG7020) et sensibles tels que TOG5307, TOG5639, TOG5649, RAM112, RAM55 pourront être séquencés. L'identification de SNP permettra, après criblage phénotypique des accessions, de mettre en évidence des gènes de résistance au BB. Le développement de populations de cartographie à partir de différents croisements entre variétés résistantes et variétés sensibles et la construction de cartes génétiques des mêmes populations permettront également d'identifier des gènes et/ou QTLs de résistance. Leur déploiement dans des régions spécifiques en Afrique devra être subordonné à leur efficacité contre les races de *Xoo* qui prévalent dans ces régions. Ceci passe par une prospection et un échantillonnage beaucoup plus large que ceux effectués antérieurement et qui n'ont pris en compte que quelques pays de l'Afrique de l'ouest et du centre notamment le Burkina, le Mali, le Niger et le Cameroun (Séré *et al.*, 2005) et plus récemment le Burkina, le Mali (Verdier *et al.*, 2009, communication personnelle), le Bénin, la Gambie, la Guinée, le Nigéria (Onasanya *et al.*, 2009) et le Niger (Basso *et al.*, 2011). Les isolats échantillonnés seront caractérisés afin d'obtenir des données exhaustives sur la distribution et la prévalence des différentes races de *Xoo* en Afrique. La caractérisation pathogénique des isolats se fait en utilisant des lignées isogéniques IRBB qui ont été construites dans le fond génétique d'IR24, une variété d'*O. sativa* appartenant à la sous-espèce indica. Ces lignées n'ont servi réellement à identifier qu'une seule race africaine, la race A1 de *Xoo* les deux autres races donnant des réactions de résistance. Le développement de lignées isogéniques appropriées dans un fond génétique africain est indispensable à la caractérisation de races africaines de *Xoo*. Certaines accessions d'*O. glaberrima* et d'*O. sativa* récemment identifiées comme sensibles aux différentes races africaines de *Xoo* (Djedatin *et al.*, 2011) pourront être utilisées comme fond génétique pour développer des lignées isogéniques par introgression de gènes de résistance à la bactériose ; lesquelles lignées seront utilisées pour différencier les races africaines de *Xoo*.

Chapitre V

Conclusion générale et perspectives

I- Conclusion générale

Pour la première fois, les présents travaux de thèse ont permis, d'une part d'identifier des sources naturelles de résistance aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et d'autre part, de cartographier des QTLs de résistance spécifiques à ces souches bactériennes, agents pathogènes de la bactériose vasculaire du riz. Nos travaux ont également mis en évidence des gènes et QTLs de résistance identifiés préalablement contre les souches asiatiques de *Xoo* et qui colocalisent avec des QTLs identifiés contre les souches africaines dans cette étude. Grâce à la sélection assistée par marqueurs, des variétés de riz résistantes à la bactériose pourront être développées en utilisant ces gènes/QTLs. Une fois déployées dans la riziculture, ces variétés contribueront à l'amélioration des rendements qui devient une nécessité incontournable pour l'alimentation d'une population sans cesse grandissante estimée à 10 ou 11 milliards d'habitants d'ici 50 ans et dont les besoins actuels en alimentation vont doubler au cours de la même période. En 1996, le sommet mondial sur l'alimentation avait fixé pour objectif la réduction de moitié, d'ici 2015, du nombre de personnes mal nourries dans le monde mais il est peu probable que cet objectif soit atteint notamment en Afrique sub-saharienne. En effet, si la tendance observée de 1982 à 2002 continue, les 200 millions de personnes sous alimentées en 2002 en Afrique sub-saharienne passeront à presque 600 millions en 2030. Il est donc important de noter que la solution passe par une révolution verte bien pensée. Telle que décrétée dans nos différents pays d'Afrique cette révolution verte ne doit pas se limiter seulement à une culture intensive par emblavement de grandes superficies grâce à la mécanisation agricole, mais doit d'abord passer par le développement de variétés performantes. Les résultats de la présente thèse contribueront donc à améliorer les performances de l'agriculture africaine, seule gage d'un développement durable.

II- Perspectives

Le criblage, en conditions contrôlées, des accessions de riz cultivé *Oryza glaberrima* a mis en évidence une vingtaine d'accessions résistantes à la souche bactérienne malienne MAI1. A court terme, ces accessions résistantes seront réévaluées en milieu naturel. Celles qui se montreront résistantes seront utilisées dans des croisements impliquant des accessions porteuses d'autres gènes d'intérêt agronomiques, ou directement déployées dans des programmes d'amélioration variétale dans des zones géographiques spécifiques. A cet effet, de nombreuses autres régions d'Afrique devront être prospectées afin d'accroître la collection de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Il sera ensuite procédé à la caractérisation moléculaire et pathogénique de la collection en vue de déterminer la structure des populations africaines de *Xoo* et leur distribution géographique la plus complète possible afin de prédire les gènes de résistance les plus efficaces.

En raison de plusieurs gènes de résistance à *Xoo* identifiés chez des espèces de riz sauvage, un intérêt particulier sera accordé, à court et moyen terme, à la recherche de nouvelles sources de résistance aux souches Africaines de *Xoo* chez les espèces de riz sauvages d'Afrique telles que *Oryza longistaminata* et *O. barthii*.

La cartographie fine des QTLs des chromosomes 7 et 11 se poursuivra. Concernant le QTL du chromosome 7, de nouveaux marqueurs seront criblés dans la région afin de réduire davantage l'intervalle de confiance. Ensuite, plusieurs autres approches pourront être développées pour identifier le(s) gène(s) impliqué(s). En effet, la banque de mutants IR64 pourra être phénotypée avec l'une des souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ayant induit le QTL. La deuxième approche est une approche transcriptomique. Dans ce cadre, des données de transcriptome IR64/MAI1 seront croisées avec celles de cibles de TALs pour identifier des candidats putatifs qui seront par la suite, validés. Cette validation pourra se faire soit par surexpression ou répression du gène cible grâce à des transformations génétiques stables ou RNAi (Waterhouse et Helliwell, 2003), soit par complémentation génétique d'un mutant (Doebley *et al.*, 1997).

En attendant l'achèvement de la cartographie fine des QTLs des chromosomes 7 et 11, l'efficacité de certains gènes de résistance durable connus sera testée sur des souches africaines de *Xoo*. Parmi ces gènes, figure Xa7 qui confère la résistance la plus durable aux souches asiatiques de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Vera Cruz *et al.*, 2000). Ceux qui se révéleront efficaces seront introgressés dans des variétés élites de riz qui sont sensibles à la maladie par le processus de la sélection assistée par marqueurs. Ils seront pyramidés dans ces variétés afin de rendre leur résistance insurmontable aux souches bactériennes. Ce fut le cas des gènes Xa7 et Xa21 (Zhang *et al.*, 2006) ; xa5, xa13 et Xa21 (Sundaram *et*

al., 2009) ; Xa4, xa5, xa13 et Xa21 (Shanti *et al.*, 2010) qui ont été introgressés avec succès dans des variétés de riz asiatiques.

Les différents gènes récessifs de résistance aux souches africaines de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* devront être clonés car le récent clonage de certains gènes d'intérêt agronomique a facilité le développement de marqueurs fonctionnels.

A long terme, de nouvelles stratégies de sélection assistée par marqueurs pourront être développées en identifiant des variants alléliques du promoteur des gènes de sensibilité comme nouvelles sources de résistance. Les accessions d'*Oryza glaberrima* identifiées comme sensibles à la bactériose, au cours de cette thèse, pourront être utilisées à cette fin.

Références bibliographiques

- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:601-611.
- Abubakar Z, Ali F, Pinel A, Traore O, N'Guessan P, Notteghem J L, Kimmins F, Konate G Fargette D. 2003. Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa. *Journal of General Virology* 84: 733-743
- Adhikari T B, Cruz V C M, Zhang Q, Nelson R J, Skinner D Z, Mew W, and Leach J E. 1995. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 966-971.
- Adhikari M and Matsu M. 2006. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. *Trends in Plant Science* 11:344-350.
- Albar L, Bangratz-Reyser M, Hébrard E, Ndjiondjop M N, Jones M, Ghesquière A. 2006. Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. *Plant Journal* 47:417–426
- Aldrick S J, Buddenha I w, and Reddy A P K. 1973. Occurrence of Bacterial Leaf Blight in Wild and Cultivated Rice in Northern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 24, 219-227.
- Alfano JR, Collmer A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology* 179:5655-5662.
- An G, Jeong D-H, Jung K-H, Lee S. 2005. Reverse Genetic Approaches for Functional Genomics of Rice. *Plant Molecular Biology*. 59:111-123.
- Arcade A, Labourdette A, Falque M, Mangin B, Chardon F, Charcosset A, Joets J. 2004. BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20: 2324-2326.
- Awoderv VA, Bangura N, John VT. 1991. Incidence, Distribution and Severity of Bacterial Diseases on Rice in West Africa. *Tropical Pest Management*. 37:113-117.

- Babu R, Nair S K, Prasanna B M, Gupta H S. 2004. Integrating marker assisted selection in crop breeding – Prospects and challenges. *Current Science* 87: 607-619
- Baggie I, Zapata F, and Sangina N. 2002. Genotypic response to aluminium toxicity of some rice. *International Rice Research Notes* 27:42.
- Bai JF, Choi SH, Ponciano G, Leung H, Leach JE. 2000. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13:1322-1329.
- Barras F, van Gijsegem F, Chatterjee A K. 1994. Extracellular Enzymes and Pathogenesis of Soft-Rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*. 32:201-234.
- Basso A, Onasanya A, Issaka S, Sido A Y, Haougui A, Adam T, Séré Y, and Saadou M. 2011. Le flétrissement bactérien du riz au Niger: diversité pathologique d'isolats collectés sur les périmètres irrigués. *Journal of Applied Biosciences* 38, 2551 – 2563
- Bednarek P, Osbourn A. 2009. Plant-Microbe Interactions: Chemical Diversity in Plant Defense. *Science*. 324:746-748.
- Blair M W, Garris A J, Iyer A S, Chapman B, Kresovich S, McCouch SR. 2003. High resolution genetic mapping and candidate gene identification at the xa5 locus for bacterial blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 107:62-73.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326:1509-1512.
- Boch J, Bonas U. 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* 48: 419-36.
- Bogdan M, Ghosh J K, Doerge R W. 2004. Modifying the Schwarz Bayesian information criterion to locate multiple interacting quantitative trait loci. *Genetics* 167: 989-999.
- Bogdanove A J, Beer S V, Bonas U, Boucher C A, Collmer A, Coplin D L, Cornelis G R, Huang H-C, Hutcheson S W, Panopoulos N J, Van Gijsegem F. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved hrp

genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*. 20:681-683.

Bogdanove A.J., Schornack S., Lahaye T., 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 4:394-401.

Bogdanove A, Koebnik R, Lu H, Furutani A, Angiuoli S, Patil B, Van Sluys M A, Ryan R, Meyer D, Han S W, Aparna G, Rajaram M, Delcher A, Phillippy A, Puiu D, Schatz M, Shumway M, Sommer D, Trapnell C, Benahmed F, Dimitrov G, Madupu R, Radune D, Sullivan S, Jha G, Ishihara H, Lee S W, Pandey A, Sharma V, Sriariyanun M, Szurek B, Vera-Cruz C, Dorman K, Ronald P, Verdier V, Dow M, Sonti R, Tsuge S, Brendel V, Rabinowicz D, Leach J, White F, Salzberg S 2011. Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *Journal of Bacteriology* 193:5450-64.

Boisnard A, Albar L, Thiemele D, Rondeau M, Ghesquiere A. 2007. Evaluation of genes from eIF4E and eIF4G multigenic families as potential candidates for partial resistance QTLs to Rice yellow mottle virus in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 116:53-62.

Boller T and Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptor. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379-406

Boman H G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*. 254:197-215.

Bonas U, Stall R, and Staskawicz B. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *Molecular Genomic and Genetic* 238: 127-136.

Bonas U, Conrads-Strauch J, and Balbo I. 1993. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Molecular Genomic and Genetic* 238: 261-268.

Borevitz J, Hazen S, Michael T et al. 2007. Genome-wide patterns of single-feature polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 12057-12062.

- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331.
- Buddenhagen I W, Vuong H H, Ba D D. 1979. Bacterial Blight found in Africa. *International Rice Research Newsletter* 4:11.
- Burr B, Burr F A, Thompson K H, Albertson M C, Stuber C W. 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118: 519-526.
- Carvalho Ado, Gomes VM. 2009. Plant defensins--Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*. 30:1007-1020.
- Century K S, Lagman R A, Adkisson M, Morlan J, Tobias R, Schwartz K, Smith A, Love J, Ronald P C, Whalen M C. 1999. Developmental control of Xa21-mediated disease resistance in rice. *Plant Journal*. 20:231-236.
- Chardon F, Virlon B, Moreau L, Falque M, Joets J, Decousset L, Murigneux A, Charcosset A. 2004. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics* 168: 2169-2185.
- Charkowski AO, Alfano JR, Preston G, Yuan J, He SY, Collmer A. 1998. The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW Protein Has Domains Similar to Harpins and Pectate Lyases and Can Elicit the Plant Hypersensitive Response and Bind to Pectate. *Journal of Bacteriology* 180:5211-5217.
- Cheema K K, Grewal N K, Vikal Y, Sharma R, Lore J S, Das A, Bhatia D, Mahajan R, Gupta V, Bharaj T, and Singh K. 2008. A novel bacterial blight resistance gene from *Oryza nivara* mapped to 38 kb region on chromosome 4L and transferred to *Oryza sativa* L. *Genetic. Ressource*. 90:397- 407.
- Chen H, Wang S, Zhang Q. 2002. A new gene for bacterial blight resistance in rice located on chromosome 12 identified from Minghui 63, and elite restorer line. *Phytopathology* 92:750–754
- Chen L Q, Hou B H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung M L, Qu X Q, Guo W J, Kim J G, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White F F, Somerville S C, Mudgett M B, and Frommer W B. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468:527-32.

- Chen S, Liu X, Zeng L, Ouyang D, Yang J, and Zhu X. 2011. Genetic analysis and molecular mapping of a novel recessive gene xa34(t) for resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Theoretical and Applied Genetics*. DOI 10.1007/s00122-011-1534-7
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124:803-814.
- Christian M, Cermak T, Doyle E L, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove A J, Voytas D F. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186: 757–761.
- Chu Z H, Fu B Y, Yang H, Xu CG, Li Z K, Sanchez A, Park Y J, Bennetzen J L, Zhang Q F, Wang S P. 2006. Targeting xa13, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 112:455-461.
- Chu Z H, Yuan M, Yao L L, Ge X J, Yuan B, Xu C G, Li X H, Fu B Y, Li Z K, Bennetzen J L, Zhang Q F, Wang S P. 2006b. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes and Development*. 20:1250-1255.
- Coakley S M, Scherm H, and Chakraborty S. 1999. Climate change and plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 37:399-426.
- Collard B C Y, Jahufer M Z Z, Brouwer J B, Pang E C K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Cordelier S, de Ruffray P, Fritig B, Kauffmann S. 2003. Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Molecular Biology*. 51:109-118.
- Cowan MM. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Review* 12:564-582.
- Cruz CMV, Bai JF, Ona I, Leung H, Nelson RJ, Mew TW, Leach JE. 2000. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:13500-13505.

- Cu R M, Mew T W, Cassman K G, and Teng R S. 1996. Effect of sheath blight on yield in tropical, intensive rice production system. *Plant Disease* 80: 1103-1108.
- Dardick C, Ronald P. 2006. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathogens* 2:14.
- Delledonne M, Zeier Jr, Marocco A, Lamb C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:13454-13459.
- Devadath F, and Dath A. 1985. Infected chaff as a source of inoculum of *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* to the rice crop. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 92: 485-488.
- Déwa K. M. K., Banito A., Onasanya A., Kpémoua K. and Séré Y. 2011. Rice bacterial blight in Togo : Importance of the disease and virulence of the pathogen. *Current Research in Bacteriology*. DOI 103923/crb.2011.
- Diaz J, Nieto C, Moriones E, Truniger V, Aranda M. 2006. Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 47: 74-83.
- Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JDG. 1996. The Tomato Cf-2 Disease Resistance Locus Comprises Two Functional Genes Encoding Leucine-Rich Repeat Proteins. *Cell*. 84:451-459.
- Djedatin G, Ndjiondjop M N, Mathieu T, Vera Cruz C M, Sanni A, Ghesquière A, and Verdier V. 2011. Evaluation of African cultivated rice *Oryza glaberrima* for resistance to bacterial blight. *Plant Disease*. 95:441-447
- Doebley J, Stec A, Ubbard L. 1997. The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386: 485-488.
- Doerge R. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Review* 3: 43-52.

- Doi K, Iwata N, Yosimura A. 2007. The construction of chromosome substitution lines of African rice (*Oryza glaberrima Steud.*) in the background of japonica rice (*Oryza sativa L.*). Rice Genetic Newsletter 14: 39-40.
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV. 1999. Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. The Plant Journal. 20:207-215.
- Dorey S, Baillieul F, Pierrel M-As, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S. 1997. Spatial and Temporal Induction of Cell Death, Defense Genes, and Accumulation of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Reacting Hypersensitively to a Fungal Glycoprotein Elicitor. Molecular Plant-Microbe Interactions. 10:646-655.
- Dow M, Newman M-A, von Roepenack E. 2000. THE induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. Annual Review of Phytopathology. 38:241-261.
- Droc G, Ruiz M, Larmande P, Pereira A, Piffanelli P, Morel J B, Dievart A, Courtois B, Guiderdoni E, and Perin C. 2006. OryGenesDB: a database for rice reverse genetics. Nucleic Acids research 1: (Database issue): D736-40.
- Durgapal JC. 1985. Self-Sown Plants from Bacterial Blight-Infected Rice Seeds - a Possible Source of Primary Infection in Northwest India. Current Science. 54:1283-1284.
- Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology. 42:185-209.
- Ebel J, Mithöfer A. 1998. Early events in the elicitation of plant defence. Planta. 206:335-348.
- Ebitani T, Takeuchi Y, Nonoue Y, Yamamoto T, Takeuchi K, Yano M. 2005. Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of indica rice cultivar "kasalath" in a genetic background of japonica elite cultivar "koshihikari". Breeding Science 55: 65-73.
- Echt C, Knapp S, Liu B H. 1992. Genome mapping with non-inbred crosses using Gmendel 2.0. Maize Genetics Cooperation Newsletter 66: 27-29.

- Edwards K, Johnstone C, and Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349
- Erbs G, Silipo A, Aslam S, De Castro C, Liparoti V, Flagiello A, Pucci P, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A, Newman M-A, Cooper RM. 2008. Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chemistry and Biology*. 15:438-448.
- Feltus F A, Wan J, Schulze S R, Still J C, Jian N, Peterson A H. 2004. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies *indica* and *japonica* genome alignments. *Genome Research* 14:1812-1819.
- Ferreira A, da Silva M F, da Costa E, Silva L, Cruz C D. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology* 29: 182-192.
- Flor H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Fuller D H, Harvey E, and Qin L. 2007. Presumed domestication? Evidence for wild rice cultivation and domestication in the fifth millennium BC of the lower Yangtze region. *Antiquity* 81: 316-331.
- Furutani A, Tsuge S, Ohnishi K, Hikichi Y, Oku T, Tsuno K, Inoue Y, Ochiai H, Kaku H, Kubo Y. 2004. Evidence for HrpXo-Dependent Expression of Type II Secretory Proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology* 186:1374-1380.
- Gao D Y, Xu Z G, Chen Z Y, Sun L H, Sun Q M, Lu F, Hu B S, Liu Y F, Tang L H. 2001. Identification of a new gene for resistance to bacterial blight in a somaclonal mutant HX-3 (*indica*). *Rice Genetic Newsletter* 18:66-68
- Garrett K, Dendy S, Frank E, Rouse M, and Travers S. 2006. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 44:489-509.
- Garris A J, Tai T H, Coburn J, Kresovich S, and McCouch S. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169: 1631-1638.
- Geffroy V, Seignac M, d'Oliveira J, Fouilloux G, Skroch P, Thoquet P, Gepts P, Langin T, and Dron M. 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus*

vulgaris and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 3:287-296.

- Ghazi I A, Srivastava P S, Dalal V, Gaikwad K, Singh A K , Sharma T R, Singh N K and Mohapatra T. 2009. Physical mapping, expression analysis and polymorphism survey of resistance gene analogues on chromosome 11 of rice. *Journal of Bioscience*. 34: 251–261
- Gnanamanickam S S, Priyadarisini V B, Narayanan N N, Vasudevan P, Kavitha S. 1999. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. *Current Science*. 77:1435-1444.
- Goff S A, Ricke D, Lan T-H, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun W-l, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. 2002. A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*. 296:92-100.
- Gonzalez-Lamothe Ro, Mitchell G, Gattuso M, Diarra M, Malouin Fo, Bouarab K. 2009. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*. 10:3400-3419.
- Gonzalez C, Szurek B, Manceau C, Mathieu T, Sere Y, Verdier V. 2007. Molecular and pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20:534-546.
- Govindappa M, Umesha S, and Lokesh S. 2011. *Adathoda vasica* leaf extract induces resistance in rice against bacterial leaf blight disease (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 3:6-14.
- Gu K, Tian D, Yang F, Wu L, Sreekala C, Wang D, Wang G L, Yin Z. 2004. High-resolution genetic mapping of Xa27(t), a new bacterial blight resistance gene in rice, *Oryza sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 108:800-807.

- Gu K Y, Yang B, Tian D S, Wu L F, Wang D J, Sreekala C, Yang F, Chu ZQ, Wang G L, White F F, Yin Z C. 2005b. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*. 435:1122-1125.
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrere S, Genin S, Boucher C. 2007. Genomic Structure and Phylogeny of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Inferred from Gene Distribution Analysis. *Journal of Bacteriology* 189:377-387.
- Guo S B, Zhang D P and Lin X H. 2010. Identification and mapping of a novel bacterial blight resistance gene Xa35(t) originated from *Oryza minuta*. *Scientia Agricultura Sinica* 43, 2611-2618.
- Gupta P K, Varshney R K, Sharma P C, Ramesh B. 1999. Molecular markers and their application in wheat breeding: a review. *Plant Breeding* 118: 369-390.
- Hajri A, Brin C, Zhao S, David P, Feng J, Koebnik R, Szurek B, Verdier V, Boureau T, Poussier S. 2011. Multilocus sequence analysis and type three effector repertoires mining provide new insights into evolutionary history and virulence of *Xanthomonas oryzae*. *Molecular and Plant Pathology* doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00745.x. [Epub ahead of print]
- Haldane J B S. 1931. The cytological basis of genetical interference. *Cytologia* 3:54–65.
- Halley S D, Afanador L K, Miklas P N, Stavely J R, Kelly J D. 1994. Heterogeneous inbred populations are useful as source of near-isogenic lines for RAPD marker localization. *Theoretical and Applied genetics* 88: 337-342.
- He P, Li J Z, Zheng X, W, Shen L S, Lu C F, Chen Y, Zhu L H. 2001. Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. *Crop Science* 41: 1240-1246.
- He P, Shan L, Sheen J. 2007. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. *Cellular Microbiology*. 9:1385-1396.
- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Nienhuis J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 761-769.

- Hirochika H, Guiderdoni E, An G et al. 2004. Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Molecular Biology* 54: 325-334.
- Horino O, Mew T W, Yamada T. 1982. The effect of temperature on the development of bacterial leaf blight on rice. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 48: 72-75.
- Hu F, Xu P, Deng X, Zhou J, Li J, Tao D. 2006. Molecular mapping of a pollen killer gene S29(t) in *Oryza glaberrima* and co-linear analysis with S22 in *O. glumaepatula*. *Euphytica* 151:273-278.
- Huang N, Angeles E R, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumaravadivel N, Bennett J, and Khush G S. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical and Applied Genetics* 95:313-320.
- Ikeda R, Sokei Y, and Akintayo I. 2007. Reliable multiplication of seed for NERICA varieties of rice, *Oryza sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54:1637-1644.
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shimozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiology* 47: 141-153.
- Iyer AS, McCouch SR. 2004. The rice bacterial blight resistance gene xa5 encodes a novel form of disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17:1348-1354.
- Iyer A S, and McCouch S R. 2007. Functional markers for xa5-mediated resistance in rice (*Oryza sativa*, L.) *Molecular Breeding* 19:291-296.
- Jansen R C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205-211.
- Jeung J U, Heu S G, Shin M S, Cruz C M V, Jena K K. 2006. Dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* populations in Korea and their relationship to known bacterial blight resistance genes. *Phytopathology*. 96:867-875.
- Jia Y, Jackson A K, Jia M H, Fjellstrom R G. 2011. Analysis of rice blast resistance gene Pi-z(t) in rice germplasm using pathogenicity

assays and DNA markers. *Euphytica*. DOI: 10.1007/s10681-011-0481-3.

- Jia Y, Lee F, and McClung A. 2009. Determination of resistance spectra to U.S. races of *Magnaporthe oryzae* causing blast in recombinant inbred line population. *Plant Disease* 93: 639-644.
- Jiang G H, Xia Z H, Zhou Y L, Wan J, Li D Y, Chen R S, Zhai W X, Zhu L H. 2006. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog *TFIIA gamma 1*. *Molecular Genetics and Genomics*. 275:354-366.
- Jones R K, et al. 1989. Identification of low-virulence strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from rice in the United States. *Phytopathology* 79: 984–990.
- Jones M P, Ding Kuhn M, Aluko G K, and Semon M. 1997. Interspecific *Oryza sativa* L. × *O. glaberrima* Steud. progenies in upland rice improvement. *Euphytica* 92:237-246.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. 2006. MicroRNAs AND THEIR REGULATORY ROLES IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology*. 57:19-53.
- Jones J D G, Dangl J L. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444:323-329.
- Jung K-H, An G, Ronald PC. 2008. Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. *Nature Reviews Genetics* 9:91-101.
- Kao C H, Zeng Z B, Teasdale R D. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216.
- Kauffman H E, Reddy A P K, Hsieh S P Y, and Merca S D. 1973. An improved technique for evaluating resistance to rice varieties of *Xanthomonas oryzae*. *Plant Disease Reporter* 57:537-541.
- Kauffmann C, Petersen BR, Bjerrum MJ. 1999. Enzymatic removal of phenols from aqueous solutions by *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. *Journal of Biotechnology*. 73:71-74.
- Kinoshita T. 1995. Report of Committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genetic Newsletter* 12:9–115

- Khush G S. 1987. Rice breeding: past, present, and future. *Journal of Genetics*. 3: 195-216.
- Khush G S, Bacalangco E, Ogawa T. 1990. A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genetics Newsletter* 7:121-122.
- Khush G S, Angeles E R. 1999. A new gene for resistance to race 6 of bacterial blight in rice, *Oryza sativa* L. *Rice Genetic Newsletter* 16:92-93
- Khush G S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030? *Plant Molecular Biology*. 59:1-6.
- Kimbrell DA, Beutler B. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews Genetics* 2:256-267.
- Klarzynski O, Fritig B. 2001. Stimulation des défenses naturelles des plantes Stimulation of plant defense responses. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. 324:953-963.
- Klement Z, Goodman RN. 1967. The Hypersensitive Reaction to Infection by Bacterial Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 5:17-44.
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayahi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M. 2002. Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promote transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiology* 43: 1096-1105.
- Komoriya K, Shibano N, Higano T, Azuma N, Yamaguchi S, Aizawa S-I. 1999. Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*. 34:767-779.
- Korinsak S, Sriprakhon S, Sirithanya P, Jairin J, Korinsak S, Vanavichit A, and Toojinda T. 2009. Identification of microsatellite markers (SSR) linked to a new bacterial blight resistance gene xa33(t) in rice cultivar 'Ba7' Maejo *International Journal of Science and Technology* 3: 235-247
- Kosambi D D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*. 12:172-175.

- Kottapalli K, Lakshmi Narasu M, and Jena K. 2010. Effective strategy for pyramiding three bacterial blight resistance genes into fine grain rice cultivar, Samba Mahsuri, using sequence tagged site markers. *Biotechnology Letters* 32: 989-996.
- Kouassi N K, N'Guessan P, Albar L, Fauquet C M, Brugidou C. 2005. Distribution and characterization of Rice yellow mottle virus: a threat to African farmers. *Plant Disease* 89:124–133
- Kumar CS, Wing RA, Sundaresan V. 2005. Efficient insertional mutagenesis in rice using the maize En/Spm elements. *The Plant Journal*. 44:879-892.
- Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newburg L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.
- Lander E S and Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Leach J E, Rhoads M L, Cruz C M V, White F F, Mew T W, and Leung H. 1992. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2188-2195.
- Lee B M, Park YJ, Park DS, Kang H W, Kim J G, Song E S, Park I C, Yoon U H, Hahn J H, Koo B S, Lee G B, Kim H, Park H S, Yoon K O, Kim J H, Jung C, Koh N H, Seo J S, Go S J. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*. 33:577-586.
- Lee F, and Rush M. 1993. Rice shealt blight: a major rice disease. *Plant Disease* 67: 829-832.
- Lee K S, Rasabandith S, Angeles E R, and Khush G S. 2003. Inheritance of resistance to bacterial blight in 21 cultivars of rice. *Phytopathology* 93:147-152.
- Lee S W, Choi S H, Han S S, Lee D G, Lee B Y. 1999. Distribution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains virulent to Xa21 in Korea. *Phytopathology*. 89:928-933.

- Li Z K, Luo L J, Mei H W, Paterson A H, Zhao X Z, Zhong D B, Wang Y P, Yu X Q, Zhu L, Tabien R, Stansel J W, Ying C S. 1999. A "defeated" rice resistance gene acts as a QTL against a virulent strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular and General Genetics*. 261:58-63.
- Li Z K, Sanchez A, Angeles E, Singh S, Domingo J, Huang N, Khush G S. 2001. Are the dominant and recessive plant disease resistance genes similar?: A case study of rice R genes and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* races. *Genetics*. 159:757-765.
- Li Z M, Zheng X M, and Song G. 2011. Genetic diversity and domestication history of African rice (*Oryza glaberrima*) as inferred from multiple gene sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 23:21–31.
- Lian X, Wang S, Zhang J, Feng Q, Zhang L, Fan D, Li X, Han B, and Zhang Q. 2006. Expression profiles of 10,422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assay using a cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 60: 617-631.
- Lin X H, Zhang D P, Xie Y F, Gao H P, Zhang Q. 1996. Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers. *Phytopathology* 86:1156–1159
- Linares O F. 2002. African rice (*Oryza glaberrima*): history and future potential. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 99: 16360-16365
- Lorieux M, Goffinet B, Perrier X, Gonzalez De Leon D, Lanaud C. 1995a. Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 1. Backcross populations. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 73–80.
- Lorieux M, Reversat G, Garcia Diaz S X, Denance C, Jouvenet N, Orioux Y, Bourger N, Pando-Bahuon A, and Ghesquiere A. 2003. Linkage mapping of Hsa-1Og, a resistance gene of African rice to the cyst nematode, *Heterodera sacchari*. *Theoretical and Applied Genetics* 107:691-696.
- Lorieux M. 2007. MapDisto, A Free User-Friendly Program For Computing Genetic Maps. Computer demonstration (P958) given at the Plant and Animal Genome XV conference, Jan 13-17 2007, San Diego, CA. URL: <http://mapdisto.free.fr/>.
- Loudet O, Gaudon V, Trubuil A, Daniel-Vedel F. 2005. Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana*

- confirmed by heterogeneous inbred family. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 742-753.
- Lozano J C. 1977. Identification of Bacterial Leaf-Blight in Rice, caused by *Xanthomonas-Oryzae*, in America. *Plant Disease Reporter* 61, 644-648.
- Lu B R, Zheng, Qian, Zhuang. 2002. Genetic differentiation of wild relatives of rice as assessed by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 106:101-106.
- Lyttle T W. 1991. Segregation distorters. *Annual Review of Genetics*. 25: 511-557.
- Maes T, De Keukeleire P, Gerats T. 1999. Plant tagology. *Trends in Plant Science* 4: 90-96.
- Mago R, Nair S, and Mohan M. 1999. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 99 : 50-57
- Maji T, Singh B N, and Akenova M E. 2001. Vegetative stage drought tolerance in *O. glaberrima* Steud and *O. sativa* L. and relationship between drought parameters. *Oryza* 38:17-23.
- Manly K F, Cudmore Jr R H, Meer J M. 2001. Map Manager QTX, crossplatform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12: 930–932.
- Martin G B, Bogdanove A J, Sessa G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review Of Plant Biology*. 54:23.
- McCallum C M, Comai L, Greene E A, Henikoff S. 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology* 18: 455-457.
- Mccouch S R And Doerge R W. 1995. QTL mapping in rice. *Trends Genetics* 11: 482–487.
- McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B, Lobos K B, Clare K, Walton M, Fu B Y, Maghirang R, Li Z K, Xing Y Z, Zhang Q F, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, Declerk G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L). *DNA Research* 9: 199-207.

- McNally K L, Bruskiewich R, Mackill D, Buell C R, Leach J E, Leung H. 2006. Sequencing multiple and diverse rice varieties. Connecting whole-genome variation with phenotypes. *Plant Physiology* 141: 26-31.
- McNally K L, Bonhert R, et al. 2009. Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and moderne varieties of rice. *Proceeding of the National Academic of ciencias*. 106: 12273-12278.
- Medzhitov R, Janeway JC. 2000. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in microbiology*. 8:452-456.
- Medzhitov R, Janeway CA. 2002. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science*. 296:298-300.
- Mew T W. 1987. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Annual Review of Phytopathology* 25:359-382.
- Mew T W. 1988. An overview of the world bacterial blight situation. In *Bacterial Blight of Rice Proceedings of the International Workshop on Bacterial Blight of Rice* pp. 7-12.
- Mew T W, Alvarez AM, Leach JE, Swings J. 1993. Focus on bacterial blight of rice. *Plant Disease* 77: 5-12.
- Miao L L, Wang C L, Zheng C K, Che J Y, Gao Y, Wen Y C, Li G Q and Zhao K J. 2010. Molecular mapping of a new gene for resistance to rice bacterial blight. *Sciential Agricultura Sinica* 43, 3051-3058.
- Mizukami T, and Wakimoto S. 1969. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. *Annual Review of Phytopathology* 7: 51-72.
- Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna T G, Yano M. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87-103.
- Mohiuddin MS, Rao YP, Mohan SK, Verma JP. 1976. Role of *Leptocorisa-Acuta* Thun in Spread of Bacterial-Blight of Rice. *Current Science*. 45:426-427.
- Monna L, Lin H, Kojima S, Sasaki T, Yano M. 2002. Genetic dissection of genomic region for a quantitative trait locus, Hd3, into two loci Hd3a and Hd3b, controlling heading date in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 104: 772-778.

- Morbitzer R., Römer P., Boch J., Lahaye T., 2010. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 107:21617-21622
- Morgante M and Salamini F. 2003. From plant genomics to breeding practice. Current Opinion in Biotechnology 14: 214-219.
- Moscou M J, and Bogdanove A J. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science, 326:1501
- Moukoubi Y D, Sié M, Vodouhe R, Bonou W, Toulou B, and Ahanchede A. 2011. Screening of rice varieties for their weed competitiveness. African Journal of Agricultural Research, 6: 5446-5456.
- Müller C, Cramer W, Hare W L, Lotze-Campen H, 2011. Climate change risks for African agriculture. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108:4313-5.
- Murty VST, Devadath S. 1981. Studies on the transmission and survival of *Xanthomonas Campestris* pv. *oryzae* through insects. Indian Phytopathology 34: 162-163.
- Murty VST, Devadath S. 1984. Role of Seed in Survival and Transmission of *Xanthomonas-Campestris* Pv *Oryzae* Causing Bacterial-Blight of Rice. Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology. 110:15-19.
- Mysore KS, Ryu C-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? Trends in Plant Science. 9:97-104.
- Nanda A K, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C. 2010. Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. Journal of Integrative Plant Biology. 52:195-204.
- Natraj P, Sujatha K, Laha G S, Srinivasa K, Mishra B, Viraktamath B C, Reddy C S, Balachandran S M, Ram T, Sheshu M, Shobha N, Neeraja C N, Ashok G, Shaik H, and Sundaram R M. 2011. Identification and fine-mapping of Xa33, a novel gene for resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Phytopathology doi: 10.1094/PHYTO-03-11-0075
- Ndjiondjop M N, Albar L, Fargette D, Fauquet C, Ghesquière A. 1999. The genetic basis of high resistance to Rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivars of two cultivated rice species. Plant Disease 83:931–935

- Nelson R J, Baraoidan M R, Cruz C M V, Yap I V, Leach J E, Mew T W, and Leung H. 1994. Relationship between phylogeny and pathotypes for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3275-3283.
- Newman M-A, Von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM. 2002. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal.* 29:487-495.
- Nwilene F E, Williams U T, Ukwungwu M N, Dakouo D, Nacro S, Hmadoun A, and Kamara, S I. 2002. Reactions of differential genotypes to African gall midge in West Africa. *International Journal of Pest Management* 48:195-201.
- Ogawa T, Yamamoto T. 1987. Selection of Recurrent Parents to Develop near-Isogenic Lines Resistant to Bacterial Leaf-Blight of Rice. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly.* 21:65-69.
- Oka H I. 1958. Varietal variation and classification of cultivated rice. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding.* 18:78-89.
- de Oliveira Borba T, Brondani R, Rangel P, Brondani C. 2009. Microsatellite marker-mediated analysis of the EMBRAPA Rice Core Collection genetic diversity. *Genetica.* 137:293-304.
- Onasanya A, Ekperigin M M, Nwilene F E, Séré Y, and Onasanya R O. 2009. Two pathotypes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* virulence identified in West Africa. *Current Research in Bacteriology* 2: 22-35
- Palacios J L, Zaror I, Martinez P, Uribe F, Opazo P, Socias T, Gidekel M, Venegas A. 2001. Subset of Hybrid Eukaryotic Proteins Is Exported by the Type I Secretion System of *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology* 183:1346-1358.
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF. 2007. Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science.* 318:113-116.
- Paterson A H. 1996. Making genetic maps. In: Paterson AH (ed.) *Genome mapping in plants*, San Diego, California: Academic Press, Austin, Texas: 23–39.

- Peng S B, et al. 2004. Rice yields decline with higher night temperature from global warming. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101:9971-9975.
- Perata P and Voeselek L A C J. 2007. Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. Trends in Plant science 12: 1164-1171.
- Pesce C. 2011. Caractérisation des gènes de sensibilité de la famille des Nodulines de type 3 induits lors de l'interaction entre *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae* et le Riz. Rapport de mémoire M2 Université Paris-Sud 11. Pp 34.
- Petpisit V, Khush GS, Kauffman HE. 1977. Inheritance of Resistance to Bacterial-Blight in Rice. Crop Science. 17:551-554.
- Pflieger S, Lefebvre V, Caranta C, Blattes A, Goffinet B, and Palloix A. 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. Genome. 42:1100- 1110.
- Pflieger S, Lefebvre V, Causse M. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. Molecular Breeding 7: 275-291.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, and the R Core team. 2009. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-93.
- PlowRight R A, Coyne D L, Nash P, and Jones M P. 1999. Resistance to the rice nematodes *Heterodera sacchari*, *Meloidogyne graminicola* and *M. incognita* in *Oryza glaberrima* and *O. glaberrima* x *O. sativa* interspecific hybrids. Nematology 1:745-752.
- Pontier D, Balagué C, Roby D. 1998. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie. 321:721-734.
- Porteres R. 1962. Berceaux agricoles primaires sur le continent africain. The Journal of African History 3: 195-210
- Postel S, Kemmerling B. 2009. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. Seminars in Cell and Developmental Biology. 20:1025-1031.
- Powell W, Machray G C, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Science 7: 215-222.

- Price A H. 2006. Believe it or not, QTLs are accurate! Trends in Plant Science 11: 213-216.
- Ram T, Laha G S, Gautam S K, Deen R, Madha M S, Brar D S, and Viraktamath B C. 2010. Identification of a new gene from *Oryza brachyantha* with broad-spectrum resistance to bacterial blight of rice in India. Rice Genetics Newsletter 25, 57-61.
- Ramalingam J, Cruz C M V, Kukreja K, Chittoor J M, Wu J L, Lee S W, Baraoidan M, George M L, Cohen M B, Hulbert S H, Leach J E, Leung H. 2003. Candidate Defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. Molecular Plant-Microbe Interactions. 16:14-24.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>.
- Reckhaus P M. 1983. Occurrence of Bacterial-Blight of rice in Niger, West Africa. Plant Disease. 67:1039-1039.
- Reckhaus PM, Adamou I. 1986. Rice diseases and their economic importance in the Niger. FAO Plant Protection Bulletin 34:77-82.
- Ren G, Xu P, Deng X, Zhou J, Hu F, Li J M, Li F, Zhang Z, and Tao D. 2005. A new gamete eliminator from *Oryza glaberrima*. Rice Genetics Newsletter 22: 45-48.
- Risch N. 1992. Genetic linkage: Interpreting LOD scores. Science 255: 803–804.
- Romer P, Recht S, Strauss T, Elsaesser J, Schornack S, Boch J, Wang S, and Lahaye T. 2010. Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. New Phytologist 187:1048-1057.
- Ronald P C, Albano B, Tabien R, Abenes L, Wu K S, Mccouch S, Tanksley SD. 1992. Genetic and Physical Analysis of the Rice Bacterial-Blight Disease Resistance Locus, Xa21. Molecular and General Genetics. 236:113-120.
- Ronald P C. 1998. Resistance gene evolution. Current Opinion in Plant Biology 1:294-298.

- Ross AF. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*. 14:340-358.
- Ruan H, Yan C, An D, Liu R, and Chen J. 2008. Identifying and Mapping New Gene xa32(t) for Resistance to Bacterial Blight(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*,Xoo) from *Oryza meyeriana* L. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*. DOI CNKI:SUN:XBNX.0.2008-06-035
- Sahrawat K L, and Sika M. 2002. Comparative tolerance of *O. sativa* and *O. glaberrima* rice cultivars for iron toxicity in West Africa. *International Rice Research Notes* 27:30-31.
- Sakraborty S, and Zeng Z. 2011. QTL Mapping for Days to Flowering under Drought Condition in Rice (*Oryza sativa* L.) Genome. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39: 58 - 63
- Salmond GPC. 1996. Pili, peptidases and protein secretion: curious connections. *Trends in Microbiology*. 4:474-476.
- Salzberg S, Sommer D, Schatz M, Phillippy A, Rabinowicz P, Tsuge S, Furutani A, Ochiai H, Delcher A, Kelley D, Madupu R, Puiu D, Radune D, Shumway M, Trapnell C, Aparna G, Jha G, Pandey A, Patil P, Ishihara H, Meyer D, Szurek B, Verdier V, Koebnik R, Dow J M, Ryan R, Hirata H, Tsuyumu S, Won Lee S, Ronald P, Sonti R, Van Sluys M A, Leach J, White F, and Bogdanove A. 2008. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics*, 9:204.
- Sanchez A C, Ilag L L, Yang D, Brar D S, Ausubel F, Khush G S, Yano M, Sasaki T, Li Z, Huang N. 1999. Genetic and physical mapping of xa13, a recessive bacterial blight resistance gene in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 98:1022-1028.
- Sandler L and Golic K. 1985. Segregation distortion in *Drosophila*. *Trends in Genetics* 1: 181-185.
- Sano Y. 1990. The genic nature of gamete eliminator in rice. *Genetics* 125: 183-191
- Sarla N, and Swamy B P M. 2005. *Oryza glaberrima*: a source for the improvement of *Oryza sativa*. *Current Sciences* 89:955–963
- Satagopan J M, Yandell B S, Newton M A, Osborn T C. 1996. A bayesian approach to detect quantitative trait loci using Markov chain Monte Carlo. *Genetics* 144: 805-816.

- Savary S, Willocquet L, Elazegui FA, Castilla NP, Teng PS. 2000a. Rice pest constraints in tropical Asia: Quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations. *Plant Disease*. 84:357-369.
- Savary S, Willocquet L, Elazegui FA, Teng PS, Van Du P, Zhu DF, Tang QY, Huang SW, Lin XQ, Singh HM, Srivastava RK. 2000b. Rice pest constraints in tropical Asia: Characterization of injury profiles in relation to production situations. *Plant Disease*. 84:341-356.
- Sawkins M, Farmer A, Hoisington D, Sullivan J, Tolokpo A, Jiang Z, Ribaut M J. 2004. Comparative Map and Trait Viewer (CMTV): an integrated bioinformatic tool to construct consensus maps and compare QTL and functional genomics data across genomes and experiments. *Plant Molecular Biology* 56: 465-480.
- Schiex T and Gaspin C. 1997. CARTHAGENE: constructing and joining maximum likelihood genetic maps. *Proceedings of Intelligent Systems in Molecular Biology* 5: 258-267.
- Scholze H, and Boch J. 2011. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology* 14:47-53.
- Second, G. 1982. Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozymes loci. *Jpn. J. Genet.* 57:25-57.
- Second G. 1985. Relations évolutives chez le genre *Oryza* et processus de domestication des riz. Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Orsay 189p.
- Semagn K, Bjørnstad A, Ndjiondjop M N. 2006a. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5 : 2540-2568.
- Semagn K, Bjørnstad A, Ndjiondjop M N. 2006b. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* 5 : 2569-2587.
- Semon M, Nielsen R, Jones M P, and McCouch S R. 2005. The population structure of African cultivated rice *Oryza glaberrima* (Steud.): evidence for elevated levels of linkage disequilibrium caused by admixture with *O. sativa* and ecological adaptation. *Genetics* 169:1639-1647.

- Sen S and Churchill G A. 2001. A statistical framework for quantitative trait mapping. *Genetics* 159: 371-387.
- Seo Y-S, Sriariyanun M, Wang L, Pfeiff J, Phetsom J, Lin Y, Jung K-H, Chou HH, Bogdanove A, Ronald P. 2008. A two-genome microarray for the rice pathogens *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* and its use in the discovery of a difference in their regulation of hrp genes. *B M C Microbiology*. 8:99.
- Sere Y, Onasanya A, Verdier V, Akator K, Ouedraogo LS, Segda Z, Mbare MM, Sido AY, Baso A. 2005. Rice Bacterial Leaf Blight in West Africa: Preliminary studies on disease in farmer's field and screening. *Asian Journal of Plant sciences*. 4:577-579.
- Shanti M L, Shenoy V V, Lalitha Devi G, Mohan Kumar V, Premalatha P, Naveen Kumar G, Shashidhar H E, Zehr U B, and Freeman W H. 2010. Marker-assisted breeding for resistance to bacterial leaf blight in popular cultivar and parental lines of hybrid rice. *Journal of Plant Pathology*. 92: 495-501.
- Shen Y W, Sharma P, da Silva FG, Ronald P. 2002. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* raxP and raxQ genes encode an ATP sulphurylase and adenosine-5' -phosphosulphate kinase that are required for AvrXa21 avirulence activity. *Molecular Microbiology*. 44:37-48.
- Shirasawa K, Shiokai S, Yamaguchi M, Kishitani S, Nishio T. 2006. Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 113:147-155.
- Sidhu G S, Khush G S, Mew T W. 1978. Genetic analysis of bacterial blight resistance in seventy-four cultivars of rice, *oryza sativa* L..*Theoretical and Applied Genetics* 53: 105-111.
- Silue D, and Notteghem J. 1991. Resistance of 99 *Oryza glaberrima* varieties to blast. *International Rice Research Newsletter* 16:13-14.
- da Silva FG, Shen Y, Dardick C, Burdman S, Yadav RC, de Leon AL, Ronald PC. 2004. Bacterial Genes Involved in Type I Secretion and Sulfation Are Required to Elicit the Rice Xa21-Mediated Innate Immune Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17:593-601.
- Singh D, Vinther F, and Mathur S. 1973. Seed transmission of bacterial leaf blight in rice. *Seed Pathology News* 15: 11.

- Song W Y, Wang G L, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H, Fauquet C, Ronald P. 1995. A Receptor Kinase-Like Protein Encoded by the Rice Disease Resistance Gene, Xa21. *Science*. 270:1804-1806.
- Soto-Suarez M, Gonzalez C, Piegu B, Tohme J, and Verdier V. 2010. Genomic comparison between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, using suppression-subtractive hybridization. *FEMS Microbiology Letters* 308:16-23.
- Stam P. 1993a. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal* 3: 739-744.
- Suiter K A, Wendel J F, Case J S. 1983. Linkage-I: A pascal computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *Journal of Heredity* 74: 203-204.
- Sun XL, Cao Y L, Yang Z F, Xu C G, Li X H, Wang S P, Zhang Q F. 2004. Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant Journal*. 37:517-527.
- Sundaram R M, Vishnupriya M R, Laha G S, Rani N S, Rao P S, Balachandran S M, Reddy G A, Sarma N P, and Sonti R V. 2009. Introduction of bacterial blight resistance into Triguna, a high yielding, mid-early duration rice variety. *Biotechnology journal* 4: 400-407
- Sugio A, Yang B, Zhu T, and White F. 2007. Two type III effector gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIA gamma 1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice sdf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 10720-10725
- Swamy P, Panchbhai A N, Dodiya P, Naik V, Panchbhai S D, Zehr UB, Azhakanandam K, Char BR. 2006. Evaluation of bacterial blight resistance in rice lines carrying multiple resistance genes and Xa21 transgenic lines. *Current Science*. 90:818-824.
- Swarup S, Yang Y, Kingsley M, and Gabriel D. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 5: 204-213.
- Swings J, Vandenmooter M, Vauterin L, Hoste B, Gillis M, Mew TW, Kersters K. 1990. Reclassification of the Causal Agents of Bacterial-

- Blight (*Xanthomonas-Campestris* Pv *Oryzae*) and Bacterial Leaf Streak (*Xanthomonas-Campestris* Pv *Oryzicola*) of Rice as Pathovars of *Xanthomonas-Oryzae* (Ex Ishiyama 1922) Sp-Nov, Nom-Rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40:309-311.
- Taguchi K K D, and Yoshimura A. 1999. RFLP mapping of S19, a gene for F1 pollen semi-sterility found in backcross progeny of *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Rice Genet News* 16: 70-71.
- Takahashi Y, Shomura A, Sasaki T, Yano M. 2001. Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 98: 7922-7927.
- Talbot N J. 2003. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology* 57 : 177-202.
- Tan G X, Ren X, Weng Q M, ShiZ Y, Zhu L L, and He G C. 2004. Mapping of a new resistance gene to bacterial blight in rice line introgressed from *O. officinalis*. *Yi Chuan Xue Bao*, 31: 724-729.
- Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Buttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klosgen U, Patschkowski T, Ruckert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorholter FJ, Weber E, Puhler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology* 187:7254-7266.
- Thiémélé D, Boisnard A, Ndjioudjop M N, Chéron S, Séré Y, Aké S, Ghesquière A, and Albar L. 2010. Identification of a second major resistance gene to Rice yellow mottle virus, RYMV2, in the African cultivated rice species, *O. glaberrima*. *Theoretical and Applied Genetics* 121:169–179
- Thomma B, Cammue B, Thevissen K. 2002. Plant defensins. *Planta*. 216:193-202.
- Thomson M J, Edwards J D, Septiningsih E M, Harrington S E, Mccouch S R. 2006. Substitution mapping of dth1.1, a flowering-time quantitative trait locus (QTL) associate with transgressive variation in rice, reveals multiple sub-QTL. *Genetics* 172: 2501-2514.

- Tian D S, Yin Z C. 2009. Constitutive heterologous expression of *avrXa27* in rice containing the R gene *Xa27* confers enhanced resistance to compatible *Xanthomonas oryzae* strains. *Molecular Plant Pathology* 10:29-39.
- Toojinda T, Broers L H, Chen X M, Hayes P M, Kleinhofs A, Korte J, Kudrna D, Leung H, Line R, Powell W, Ramsey L, Vivar H, and Waugh R. 2001. Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). *Theoretical and Applied Genetics*. 101:580-589
- Triplett L R, Hamilton J P, Buell C R, Tisserat N A, Verdier V, Zink F, Leach J E. 2011. Genomic Analysis of *Xanthomonas oryzae* from US Rice Reveals Substantial Divergence from Known *X. oryzae* Pathovars. *Applied and Environmental Microbiology* 77:3930-7.
- Tuinstra M R, Ejeta G, Goldsbrough P B. 1997. Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1005-1011.
- Uimari P and Hoeschele I. 1997. Mapping-linked quantitative trait loci using Bayesian analysis and Markov chain Monte Carlo algorithms. *Genetics* 146: 735-743.
- Van Enckevort L, Droc G, Piffanelli P et al. 2005. EU-OSTID: a collection of transposon insertional mutants for functional genomics in rice. *Plant Molecular Biology* 59: 99-110.
- Van Ooijen J W, and Voorrips R E. 2001. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vaughan D A, Kadowaki K, and Tomooka N. 2005. On the phylogeny and biogeography of the genus *Oryza*. *Breeding science* 55: 113-122.
- Vaughan D, Lu B-R, Tomooka N. 2008. Was Asian Rice (*Oryza sativa*) Domesticated More Than Once? *Rice*. 1:16-24.
- Vera Cruz C M, Bai J F, Ona I, Leung H, Nelson R J, Mew T W, Leach J E. 2000. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13500-13505.

- Verdier V, Vera Cruz C, and Leach J E. 2011. Controlling rice bacterial blight in Africa: needs and prospects. *Journal of Biotechnology* (in press) doi:10.1016/j.jbiotec.2011.09.020
- Veyrieras J B, Goffinet B, Charcosset A. 2007. MetaQTL: A package of new computational methods for the meta-analysis of QTL mapping experiments. *BMC bioinformatic* 8:49.
- Vikal Y, Das A, Patra B, Goel R K, Sidhu J S, and Singh K. 2007. Identification of new sources of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in wild *Oryza* species and *O. glaberrima*. *Plant Genetic Resources* 5:108-112.
- Virk P S, Ford-Lloyd B V, Jakson M T, and Newbury H J. 1995. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity* 74: 170-179.
- Vitte C, Ishii T, Lamy F, Brar D, and Panaud O. 2004. Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice. *Molecular Genetics and Genomics*. 272: 504-511.
- Vlot AC, Klessig DF, Park S-W. 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*. 11:436-442.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–1444.
- Walters D. 2003. Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist*. 159:109-115.
- Wang C, Wen G, Lin X, Liu X, and Zhang D. 2009. Identification and fine mapping of a new bacterial blight resistance gene, *Xa31(t)* in rice. *European Journal of Plant Pathology* 123 : 235–240.
- Wang C L, Xu A B, Gao Y, Fan Y L, Liang Y T, Zheng C K, Sun L Q, Wang W Q, Zhao K J. 2009. Generation and characterisation of *Tn5-tagged Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* mutants that overcome *Xa23*-mediated resistance to bacterial blight of rice. *European Journal of Plant Pathology*. 123: 343-351.
- Wang G, Mackill D J, Bonman J M, McCouch S R, and Nelson R J. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast resistance in a durably resistant rice cultivar. *Genetics*. 136: 1421-1434.

- Wang G L, Song W Y, Ruan D L, Sideris S, and Ronald P C. 1996. The cloned gene, Xa21, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 9:850-855.
- Wang G L, Ruan D L, Song W Y, Sideris S, Chen L L, Pi L Y, Zhang S P, Zhang Z, Fauquet C, Gaut B S, Whalen M C, Ronald P C. 1998. Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell*. 10:765-779.
- Wang G, Wan X, Crossa J, Crouch J, Weng J, Zhai H, and Wan J. 2006. QTL mapping of grain length in rice (*Oryza sativa* L.) using chromosome segment substitution lines. *Genetical Research* , 88: 93-104
- Wang H et al. 2005a. Bayesian shrinkage estimation of quantitative trait loci parameters. *Genetics* 170: 465-480.
- Wang W, Zhai W, Luo M, Jiang G, Chen X, Li X, Wing RA, Zhu L. 2001. Chromosome landing at the bacterial blight resistance gene Xa4 locus using a deep coverage rice BAC library. *Molecular Genetics and Genomics*. 265:118-125.
- Wang X S, Zhu J, Mansueto L, Bruskiwich R. 2005b. Identification of candidate gene for drought stress tolerance in rice by the integration of a genetic (QTL) map with rice genome physical map. *Journal of Zhejiang University Science* 6:382-388.
- WARDA 2000. Rapport annuel d'activités
- Waterhouse P M and Helliwell C A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Review of Genetics* 4: 29-38.
- Webb K M, Oña I, Bai J, Garrett K A, Mew T, Vera Cruz C M, Leach J E. 2010. A benefit of high temperature: increased effectiveness of a rice bacterial blight disease resistance gene. *New Phytologist*. 185:568-76.
- Welch J R, et al. 2010. Rice yields in tropical/subtropical Asia exhibit large but opposing sensitivities to minimum and maximum temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:14562-14567.

- White F F, and Yang B. 2009. Host and Pathogen Factors Controlling the Rice-*Xanthomonas oryzae* Interaction. *Plant Physiology*. 150:1677-1686.
- Williams C T, Hidievbie O, Ukwungwu M N, Dakouo D, Nacro S, Hamadoun A. and Kamara S I. 1999. Multilocational screening of *O. sativa* and *O. glaberrima* for resistance to African gall midge *O. oryzovora*. *International Rice Research Notes* 24:26-27.
- Willocquet L, Elazegui FA, Castilla N, Fernandez L, Fischer KS, Peng SB, Teng PS, Srivastava RK, Singh HM, Zhu DF, Savary S. 2004. Research priorities for rice pest management in tropical asia: A simulation analysis of yield losses and management efficiencies. *Phytopathology*. 94:672-682.
- de Wit P J G M, Laugé R, Honée G, Joosten M H A J, Vossen P, Kooman-Gersmann M, Vogelsang R, Vervoort J J M. 1997. Molecular and biochemical basis of the interaction between tomato and its fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 71:137-141.
- Wonni I, Ouedraogo L, Verdier V. 2011. First Report of Bacterial Leaf Streak Caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* on Rice in Burkina Faso. *Plant Disease* 1: 72.
- Wu J L, Wu C J, Lei C L, Baraoidan M, Bordeos A, Madamba M R S, Ramos-Pamplona M, Mauleon R, Portugal A, Ulat VJ, Bruskiewich R, Wang GL, Leach J, Khush G, Leung H. 2005. Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Molecular Biology*. 59:85-97.
- Wu L, Goh M L, Sreekala C, Yin Z. 2008b. XA27 Depends on an Amino-Terminal Signal-Anchor-Like Sequence to Localize to the Apoplast for Resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiology*. 148:1497-1509.
- Wu X, Li X, Xu C, Wang S. 2008. Fine genetic mapping of *xa24*, a recessive gene for resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 118:185–191
- Xi Z Y, Zeng R Z, Zhang Z M, Ding X H, Li W T, Zhang G Q. 2006. Development of a wide population of chromosome single-segment substitution lines in the genetic background of an elite cultivar of rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* 49: 476-484.

- Xiang Y, Cao Y L, Xu C G, Li X H, Wang S P. 2006. Xa3, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as Xa26. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:1347-1355.
- Xie G, and Mew T. 1998. A leaf inoculation method for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* from rice seed. *Plant Disease* 82: 1007-1011.
- Xu S. 2003. Estimating polygenic effects using markers of the entire genome. *Genetics* 163: 789-801.
- Xu W H, Wang Y S, Liu G Z, Chen X, Tinjuangjun P, Pi L Y, Song W Y. 2006. The autophosphorylated Ser686, Thr688, and Ser689 residues in the intracellular juxtamembrane domain of XA21 are implicated in stability control of rice receptor-like kinase. *The Plant Journal*. 45:740-751.
- Yang B, Sugio A, White F F. 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:10503-10508.
- Yang D, Sanchez A, Khush G S, Zhu Y, Huang N. 1998. Construction of a BAC contig containing the xa5 locus in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 97:1120-1124.
- Yang Z, Sun X, Wang S, Zhang Q. 2003. Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 106:1467-1472.
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T. 2000. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice is closely related to the Arabidopsis flowering-time gene CONSTANS. *The Plant Cell* 12: 2473-2484.
- Yazaki J, Kojima K, Suzuki K, Kishimoto N, Kikushi S. 2004. The rice PIPELINE: a unification tool for plant functional genomics. *Nucleic Acids Research* 32: 383-387.
- Yoshimura S, Yoshimura A, Saito A, Kishimoto N, Kawase M, Yano M, Nakagahra M, Ogawa T, Iwata N. 1992. Rflp Analysis of Introgressed Chromosomal Segments in 3 near-Isogenic Lines of Rice for Bacterial-Blight Resistance Genes, Xa-1, Xa-3 and Xa-4. *Japanese Journal of Genetics*. 67:29-37.

- Yoshimura S, Umehara Y, Kurata N, Nagamura Y, Sasaki T, Minobe Y, Iwata N. 1996. Identification of a YAC clone carrying the Xa-1 allele, a bacterial blight resistance gene in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 93:117-122.
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang ZX, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, Sasaki T. 1998. Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:1663-1668.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK-S, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H. 2002. A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*. 296:79-92.
- Yu J, Wang J, Lin W, Li S, Li H, Zhou J, Ni P, Dong W, Hu S, Zeng C, Zhang J, Zhang Y, Li R, Xu Z, Li S, Li X, Zheng H, Cong L, Lin L, Yin J, Geng J, Li G, Shi J, Liu J, Lv H, Li J, Wang J, Deng Y, Ran L, Shi X, Wang X, Wu Q, Li C, Ren X, Wang J, Wang X, Li D, Liu D, Zhang X, Ji Z, Zhao W, Sun Y, Zhang Z, Bao J, Han Y, Dong L, Ji J, Chen P, Wu S, Liu J, Xiao Y, Bu D, Tan J, Yang L, Ye C, Zhang J, Xu J, Zhou Y, Yu Y, Zhang B, Zhuang S, Wei H, Liu B, Lei M, Yu H, Li Y, Xu H, Wei S, He X, Fang L, Zhang Z, Zhang Y, Huang X, Su Z, Tong W, Li J, Tong Z, Li S, Ye J, Wang L, Fang L, Lei T, Chen C, Chen H, Xu Z, Li H, Huang H, Zhang F, Xu H, Li N, Zhao C, Li S, Dong L, Huang Y, Li L, Xi Y, Qi Q, Li W, Zhang B, Hu W, Zhang Y, Tian X, Jiao Y, Liang X, Jin J, Gao L, Zheng W, Hao B, Liu S, Wang W, Yuan L, Cao M, McDermott J, Samudrala R, Wang J, Wong GK-S, Yang H. 2005. The Genomes of *Oryza sativa*: A History of Duplications. *PLoS Biology*. 3:e38.
- Yu J, Pressoir G, Briggs W H, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley J F, McMullen M D, Gaut B S, Nielsen D M, Holland J B, Kresovich S, Buckler E S. 2006. A unified mixed-model method for association

mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics* 38: 203-208.

- Yu Y, Streubel J, Balzergue S, Champion A, Boch J, Koebnik R, Feng J, Verdier V, and Szurek B. 2011. Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector which induces the rice nodulin-3 *Os11N3* gene. *Molecular Plant-Microbe Interaction* Jun 16. [Epub ahead of print]
- Yuan M, Chu Z, Li X, Xu C, and Wang S. 2009. Pathogen-induced expressional loss of function is the key factor in race-specific bacterial resistance conferred by a recessive R gene *xa13* in rice. *Plant cell physiology* 50: 947-955
- Zamir D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Review of Genetics* 2: 983-989.
- Zeigler R S, and Savary S. 2010. Plant diseases and the world's dependence on rice. In *The Role of Plant Pathology in Food Safety and Food Security*, pp. 3-9.
- Zeng Z B. 2000. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- Zeng H, Luo L, Zhang W, Zhou J L I Z, Liu H, Zhu T, Feng X, Zhong Y. 2007. PlantQTL-GE: a database system for identifying candidate genes in rice and *Arabidopsis* by gene expression and QTL information. *Nucleic Acids research* 35: 879-882.
- Zhang G, Angeles E R, Abenes M L P, Khush G S, Huang N. 1996. RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene *xa-13* in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 93:65-70.
- Zhang J, Li X, Jiang G, Xu Y, He Y. 2006. Pyramiding of *Xa7* and *Xa21* for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice. *Plant Breeding*. 125:600-605.
- Zhang Q, Lin S C, Zhao B Y, Wang C L, Yang W C, Zhou Y L, Li D Y, Chen C B, and Zhu L H. 1998. Identification and tagging a new gene for resistance to bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) from *O. rufipogon*. *Rice Genetics Newsletter* 15:138-142.
- Zhang Y, Bak DD, Heid H, Geider K. 1999. Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. *Journal of Molecular Biology* 289:1239-1251.

- Zhao Z, Jiang L, Zhang W, Yu C, Zhu S, Xie K, Tian H, Liu L, Ikehashi H, Wan J. 2007. Fine mapping of S3l, a gene responsible for hybrid embryo-sac abortion in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 226: 1087—1096.
- Zheng Y F, Sun G P, and Chen X Y. 2007. Characteristics of the short rachillae of rice from archeological sites dating to 7000 years ago. *Chinese Science Bulletin* 52: 1654-1660.
- Zheng C, Wang C, Yu Y, Liang Y, Zhao K. 2009. Identification and molecular mapping of *Xa32(t)*, a novel resistance gene for bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) in rice. *Acta Agronomica Sinica* 7: 1173-1180
- Zhu W and Buell R. 2007. Improvement of whole-genome annotation of cereals through comparative analysis. *Genome Research* 17:299-310.
- Zou J H, Pan X B, Chen Z, Xu J Y, Lu J F, Zhai W X, and Zhu L H. 2000. Mapping quantitative trait loci controlling sheath blight resistance in two rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 569-573.

