MONTPELLIER SUPAGRO

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER

ECOLE DOCTORALE : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement

Spécialité : Biologie Intégrative des plantes

Présentée et soutenue publiquement par

Elsa BALLINI

Le 17 Décembre 2007

Etude des interactions riz-*Magnaporthe oryzae*. Diversité, origine et évolution du locus du gène de résistance *Pi33*.

JURY

M. Jean-Loup NOTTEGHEM (Professeur à SupAgro.M), Directeur de thèse

Mme Catherine FEUILLET (Directeur de Recherche à l'INRA de Clermont-Ferrand), Rapporteur

M. Thierry ROUXEL (Directeur de Recherche à l'INRA de Versailles), Rapporteur

Mme Valérie GEFFROY (Chargée de Recherche à l'INRA d'Orsay), Examinateur

M. Jean-Benoît MOREL (Chargé de Recherche à l'INRA de Montpellier), Examinateur

M. Didier THARREAU (Chercheur au CIRAD de Montpellier), Co-Directeur de thèse

Doctorat réalisé au sein de l'équipe interactions riz-parasites de l'UMR Biologie et Génétique des Interactions Plantes-Parasites, TA A54/K, 34398 Montpellier CEDEX 05, France.

MONTPELLIER SUPAGRO

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER

ECOLE DOCTORALE : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement

Spécialité : Biologie Intégrative des plantes

Présentée et soutenue publiquement par

Elsa BALLINI

Le 17 Décembre 2007

Etude des interactions riz-*Magnaporthe oryzae*. Diversité, origine et évolution du locus du gène de résistance *Pi33*.

JURY

M. Jean-Loup NOTTEGHEM (Professeur à SupAgro.M), Directeur de thèse

Mme Catherine FEUILLET (Directeur de Recherche à l'INRA de Clermont-Ferrand), Rapporteur

M. Thierry ROUXEL (Directeur de Recherche à l'INRA de Versailles), Rapporteur

Mme Valérie GEFFROY (Chargée de Recherche à l'INRA d'Orsay), Examinateur

M. Jean-Benoît MOREL (Chargé de Recherche à l'INRA de Montpellier), Examinateur

M. Didier THARREAU (Chercheur au CIRAD de Montpellier), Co-Directeur de thèse

« La promenade..., entre les rizières du plus pur émeraude, entre les aréquiers, muets et graves comme des colonnes d'un temple, et parmi les bambous géants du Jardin, où rugissent les panthères noires, les panthères tachetées et les tigres. »

Claude Farrère (1876-1957)

Remerciements

Je souhaite ici remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Je pense d'abord bien sûr à mes deux directeurs de thèse : Jean-Loup Notteghem et Didier Tharreau (dans mon cœur tu as ton HDR). Je les remercie de m'avoir tout d'abord acceptée au sein de cette équipe et ensuite de m'avoir consacré tout leur temps, pour permettre ainsi ma formation.

Je souhaite également remercier le comité de thèse qui s'est réuni à deux reprises au cours de cette thèse : Véronique Lefebvre, Olivier Panaud, Marc-Henri Lebrun et Jean-Benoît Morel. Leurs conseils ont permis non seulement de m'encourager mais surtout d'ouvrir de nombreuses pistes de réflexion.

Au jour le jour, de nombreux membres de l'équipe m'ont conseillée et aidée dans mes différentes activités :

Emilie Vergne et Jean-Benoît Morel, sans leur collaboration étroite, cette thèse n'aurait certainement pas été ce qu'elle est aujourd'hui.

Elisabeth Fournier, Judith Hirsch, Nabila Yahiaoui, Thomas Kroj et Jerôme Collemare (Bayer-Lyon) qui ont participé à la relecture du manuscrit. Odile Faivre-rampant et Lucie Miché qui m'ont également donné de précieux conseils.

Tout le personnel technique permanent dont l'aide a été plus que précieuse tout au long de cette thèse et qui ont participé à l'obtention des résultats : Henri Adreit, Véronique Chalvon, Julien Frouin, Corinne Michel, Joëlle Milazzo.

Je souhaite faire ici une mention spéciale aux serristes, Henri Adreit, Christophe Tertois et Loïc Fontaine sans qui l'idée même d'expérimentation ne serait plus possible. Je souhaite remercier tout particulièrement Loïc d'avoir patiemment multiplié des riz sauvages plus que récalcitrants.

Je souhaite également remercier tous les stagiaires et CDD qui ont ajouté leur pierre à l'édifice : Marc Galland, Sabrina Marques (merci pour les corrections !), Belkacem Sidi-Mammar, Chloé Fallet, Cyrille Zini, Mélodie Bousquet, Sylvie Vancoppenolle et Véronique Lantheaume.

Je remercie Daniel Gargani pour m'avoir initiée à la microscopie électronique. Je souhaite également remercier Alain Ghesquière et Romain Guyot pour m'avoir accueillie à l'IRD et donnée accès à la banque BAC IR64 et Gérard Second, pour m'avoir fournie un échantillon important de riz sauvages. Merci à l'équipe d'Emmanuel Guiderdoni qui a participé activement aux expériences de complémentation. Merci aux bioinformaticiens du CIRAD et notamment à Gaétan Droc pour son aide dans l'élaboration de la base de donnée ARCHIPELAGO.

Merci aux non permanents de l'UMR pour nos réunions socialo-scientifiques du mercredi !

Cette thèse s'est effectuée en parallèle à une activité de monitorat au sein de l'UFR Sciences de l'Université de Montpellier II. Il serait trop long de citer tous ceux que j'ai croisés pendant ces trois ans et qui m'ont beaucoup appris et surtout donné le goût de l'enseignement, mais je pense tout particulièrement aux préparateurs des salles et aux organisateurs des modules. Je remercie tout spécialement Sylvain Glémin, Marc-André Sélosse, Agnès Mignot et Christine Heinz.

Enfin, je pense bien sûr à mes amis, à ma famille... et à Eric pour tout le reste et bien plus encore...

Abréviations:

ACE1 = Avirulence Conferring Enzyme 1

ARC = Domaine présent dans les protéines Apaf-1, R et CED-4

Gène AVR = gène d'avirulence de l'agent pathogène

CC = Coil-Coiled domain

ETI = Effector-Triggered Immunity

Gène R = gène de résistance spécifique des plantes

HR = Réponse Hypersensible

IRRI = International Rice Research Institute

LRR = Leucine Rich Repeat domain

NBS = Nucleotide Binding Site

NRPS = Peptide Synthétase Non Ribosomale

PAMP = Pathogen Associated Molecular Pattern

PKS = Polycétide Synthase

PR = Protéine de Résistance

PRR = Pattern Recognition Receptor

PTI = PAMP-Triggered Immunity

RGA = Resistance Gene Analogue

TIR = Toll-InterLeukine

Table des Matières

Remerciements 4

Abréviations 6

Table des Matières 7

Table des Figures 11

Table des tableaux 13

I Introduction 15

I.1 Les interactions des plantes avec les agents pathogènes 15
I.1.1 Quelques définitions 15
I.1.2 La relation gène-pour-gène 17
a Enoncé de la théorie gène-pour-gène 17
b Interprétation biochimique de la théorie gène-pour-gène 19
c Intégration de la reconnaissance spécifique dans le système de défense 23

I.2 Présentation du pathosystème 25
I.2.1 Le riz, plante agronomiquement importante 25
I.2.2 *Magnaporthe oryzae* agent causal de la pyriculariose 27
a Symptômes et dégâts 27
b Biologie de *Magnaporthe oryzae* 27
c Lutte contre la pyriculariose 29
I.2.3 Une revue des gènes et QTLs de résistance à *Magnaporthe oryzae*. 32
I.2.4 Les gènes de résistance à la pyriculariose clonés 79
I.2.5 Le pathosystème *O. sativa/M. oryzae,* modèle d'étude des interactions céréales/champignons phytopathogènes. 81

I.3 L'interaction ACE1/Pi33 83
I.3.1 Le gène d'avirulence *ACE1* 83
I.3.2 Cartographie génétique de *Pi33* 85
I.3.3 Originalités de l'interaction ACE1/Pi33. 87

I.4 Objectifs de la thèse 88

II Chapitre 1 : Origine de *Pi33* 91

II.1 Introduction 93
II.1.1 Une origine ancienne des gènes de résistance 93
a La course à l'armement 95
b La guerre des tranchées 96
c Limites des interprétations d'analyse moléculaires et hypothèses alternatives de co-évolution 98
d Distribution des gènes de résistance chez les espèces domestiquées et leur ancêtres sauvages, quelques exemples 98
II.1.2 Structuration du genre *Oryza* 102
II.1.3 Résultats préliminaires 104
II.1.4 Objectifs 106

II.2 Article 2: Modern elite rice varieties of the 'Green Revolution' have retained a large introgression from wild rice around the Pi33 rice blast resistance locus. 107

II.3 Distribution et Origine de Pi33 121
II.3.1 Résultats 121
a Sources de *Pi33* dans les variétés améliorées. 121
b Distribution de *Pi33* au sein de l'espèce *Oryza sativa* 123
c Distribution de *Pi33* au sein des autres espèces du genre *Oryza*. 125
II.3.2 Discussion 127
a Plusieurs sources de résistance *Pi33* dans les variétés améliorées 127
b Distribution de *Pi33* au sein des espèces cultivées et sauvages du genre *Oryza* 129
b.1 Un échantillonnage limité par le niveau de virulence des souches de M. oryzae 129

b.2 Possibilité d'allofécondation entre espèces sauvages et cultivées **131**
b.3 Une convergence évolutive à l'origine des reconnaissances de ACE1 dans les espèces sauvages
b.4 Une origine ancienne de Pi33 **133**
c Une co-évolution ancienne entre *ACE1* et *Pi33* ? **135**

II.4 Matériels et Méthodes **137**
II.4.1 Matériel fongique et inoculation **137**
II.4.2 Matériel végétal et culture **137**
II.4.3 Données moléculaires **138**

III Chapitre 2 : Cartographie et clonage de *Pi33* **139**

III.1 Introduction **141**
III.1.1 Les gènes de résistance : structure, fonction et organisation génomique **141**
a Les différents types de gènes de résistance **141**
a.1 Les récepteurs membranaires **141**
a.2 Les protéines de résistance cytoplasmiques **142**
b La fonction des différents domaines des gènes de résistance **143**
c L'organisation des gènes de résistance dans le génome **148**
III.1.2 Hypothèses moléculaires de l'évolution des gènes de résistance **150**
III.1.3 Objectifs **153**

III.2 Résultats **155**
III.2.1 Cartographie physique de *Pi33* **155**
III.2.2 Structure et diversité au sein du cluster *Pi33* **161**
a Polymorphisme structurale au sein du cluster **163**
a.1 Diversité au sein du cluster de LRR-kinases **163**
a.2 Diversité au sein du cluster de NBS-LRR **165**
a.3 Comparaison de la structure du locus dans différents fonds génétiques **165**
b Polymorphisme allélique des membres du cluster **167**
c Polymorphisme d'expression des membres du cluster **169**
III.2.3 Clonage de Pi33 **171**
a Clonage de *Pi33* par analyse de mutants **171**
a.1 Criblage d'une banque de mutants d'IR64 par TILLING **171**
a.2 Criblage phénotypique d'une banque de mutants de C101LAC **173**
b Clonage de *Pi33* par complémentation **175**

III.3 Discussion **176**
III.3.1 Structure et diversité au sein du cluster de *Pi33* **176**
a De légères déviations de la colinéarité **176**
b Un cluster ancien régi par le modèle « birth and death » **176**
c Des domaines LRR conservés **178**
III.3.2 Clonage de *Pi33* **180**
a Identification de gènes candidats pour *Pi33* **180**
b Clonage de *Pi33* par analyse de mutants **181**
c Clonage de *Pi33* par complémentation **181**

III.4 Conclusion et perspectives **182**

III.5 Matériels et Méthodes **183**
III.5.1 Cartographie de *Pi33* et caractérisation du cluster **183**
a Matériel végétal **183**
b Données génomiques **183**
c Criblage des banques BAC **184**
d Séquençage, assemblage et annotation des clones BAC **184**
e Séquençage des gènes candidats **185**
f Données d'expression des gènes **185**
III.5.2 Criblage de banques de mutants **187**
a Matériel végétal et culture du riz **187**
b Criblage des banques de mutants **188**
c Caractérisation des mutants, données moléculaires **188**
III.5.3 Clonage de *Pi33* **190**

IV Chapitre 3 : Tranduction du signal *Pi33* **192**

IV.1 Introduction **194**
IV.1.1 Les réactions de défense chez les plantes **194**
a La reconnaissance **194**
b La régulation **194**
c La transduction du signal **196**
d Les mécanismes de défense **198**
IV.1.2 Les réactions de défense chez le riz **200**
IV.1.3 Quelles similitudes entre les réactions de défense induites par différents types d'interactions ? **204**
IV.1.4 Objectifs **205**

IV.2 Early and specific gene expression triggered by rice resistance gene Pi33 in response to infection by ACE1 avirulent blast fungus

IV.3 Influence de Pi33 sur les réactions de défense **222**
IV.3.1 Résultats **222**
a Création d'un jeu de gènes spécifiques des réactions de défense **222**
b Validation du jeu de données par RT-PCR Quantitative (QPCR) **226**
c Comparaison de l'expression de gènes de défense dans le cadre de différentes interactions **227**
c.1 Comparaison des expressions entre les conditions compatibles et incompatibles **227**
c.2 Comparaison des expressions entre plusieurs conditions incompatibles **228**
c.2.1 Expériences préliminaires **229**
c.2.2 Contraintes expérimentales **229**
c.2.3 Influence du gène de résistance et du fond génétique sur l'expression des gènes de défense.
IV.3.2 Discussion et conclusion **236**
a Originalité de la voie de défense contrôlée par *Pi33* **236**
b Influence du fond génétique sur le système de défense **238**
IV.3.3 Matériels et Méthodes **239**
a Matériel végétal et fongique **239**
b Données moléculaires **239**

V Conclusion générale **242**

V.1 Création d'une base de données Riz/M. oryzae **243**

V.2 Une origine ancienne de Pi33 **244**

V.3 Une cartographie physique de Pi33 **245**

V.4 Influence de Pi33 sur les voies de défense **245**

V.5 Perspectives à moyen terme : après le clonage **246**

VI Bibliographie **248**

VII Annexes **282**

VII.1 Annexe 1 : préparation d'inoculum et inoculation avec Magnaporthe oryzae **283**
VII.1.1 Culture de *M. oryzae* **283**
VII.1.2 Préparation de l'inoculum et inoculation **283**

VII.2 Annexe 2 : Culture du riz en serre **284**
VII.2.1 Semis **284**
VII.2.2 Condition de culture **284**

VII.3 Annexe 3 : Phénotypes des variétés de riz cultivés O. sativa **285**

VII.4 Annexe 4 : Phénotypes des accessions de riz sauvages **287**

VII.5 Annexe 5 : Génotypage de l'introgression au locus Pi33 **289**

VII.6 Annexe 6 : Annotation des gènes du Cluster **290**
VII.6.1 Annotation du cluster chez Nipponbare **290**
VII.6.2 Annotation du cluster chez 93-11 **290**
VII.6.3 Annotation du cluster chez IR64 **291**

VII.7 Annexe 7 : Bilan de l'assemblage des clones BAC IR64 **292**

VII.8 Annexes 8 : Homologies de séquences **293**

VII.9 Annexe 9 : Liste des amorces utilisées **294**

VII.9.1 Amorces pour le génotypage de variétés sur l'ensemble du génome et au locus *Pi33* **294**
VII.9.2 Amorces pour le génotypage de variétés sur l'ensemble du chromosome 8 **294**
VII.9.3 Amorces pour le séquençage des gènes candidats **295**
VII.9.4 Amorces utilisées pour les PCR long-range encadrant les gène NB11-3,5 et NB11-4,5 **296**
VII.9.5 Amorces pour l'analyse d'expression par Q-PCR au locus *Pi33* **296**
VII.9.6 Amorce pour criblage par Tilling sur les mutants IR64 **296**
VII.9.7 Amorces pour séquençage des mutants C101LAC **296**
VII.9.8 Amorce pour la validation par RT-PCR Quantitative des gènes de puces **297**

VII.10 Annexe 10 : Amplification par PCR **298**

VII.11 Annexe 11 : Criblage des banques BAC **299**
VII.11.1 Banques BAC disponibles **299**
VII.11.2 Clones BAC séquencés ou en cours de séquençage **299**
VII.11.3 Criblage par hybridation **299**
a Préparation de la sonde **299**
b Pré-hybridation et hybridation des membranes **299**
c Lavage des membranes **300**
d Composition des Tampons **300**
VII.11.4 Criblage par PCR **300**
VII.11.5 Amorces pour criblage de la banque BAC IR64 **301**

VII.12 Annexe 12 : Transformation des bactéries **302**
VII.12.1 Transformation bactérienne par choc thermique **302**
VII.12.2 Transformation bactérienne par électroporation **302**

VII.13 Annexe 13 : Extraction d'ADN plasmidique **303**
VII.13.1 Milieu de culture **303**
VII.13.2 Extraction d'ADN plasmidique des clones BAC **303**
VII.13.3 Extraction d'ADN de vecteur **303**

VII.14 Annexe 14 : Clonage **305**
VII.14.1 Digestion **305**
VII.14.2 Purification Phénol / Chloroforme **305**
VII.14.3 Ligation **305**
VII.14.4 Vérification des clones **305**
VII.14.5 Amorces pour vérification du clonage **306**

VII.15 Annexe 15 : Carte de restrictions des vecteurs **307**
VII.15.1 pBeloBAC 11 (7.5 kb) **307**
VII.15.2 pCAMBIA 5300 (9.8 kb) **307**
VII.15.3 pCAMBIA2300 OverExp (11,2 kb) **308**
VII.15.4 pTAC37 (24,7 kb) **308**

Table des Figures

Figure 1.1. Illustration des symptômes de résistance complète, partielle et sensibilité. **14**

Figure 1.2. Schématisation de la relation gène-pour-gène définie par Flor (1973). **16**

Figure 1.3. Modèles biochimiques de la relation gène-pour-gène. **18**

Figure 1.4. Reconnaissance spécifique des plantes par leurs protéines de résistance R, via l'interaction avec une troisième protéine cible de la protéine d'avirulence AVR. **20**

Figure 1.5. Schéma des différentes phases du système de défense de la plante. **2**Erreur ! Signet non défini.

Figure 1.6. Schéma de co-évolution entre résistance des plantes et pathogénie des agents pathogènes. **2**Erreur ! Signet non défini.

Figure 1.7. Symptômes et dégâts provoqués par *Magnaporthe oryzea* sur la culture de riz. **26**

Figure 1.8. Cycle infectieux de *Magnaporthe oryzea*. **28**

Figure 1.9. Synténie entre les génomes de céréales. **8**Erreur ! Signet non défini.

Figure 1.10. Fonction moléculaire de *ACE1*. **84**

Figure 1.11. Modèle d'interaction entre *Magnaporthe oryzea* (ACE1) et le riz (Pi33). **86**

Figure 1.12. Cartographie composite des gènes *Pi-11(t), Pi-29(t), Pi33*. **86**

Figure 2.1. Contournement de la résistance dans les variétés modernes d'Amérique latine de 1969 à 1982. **9**Erreur ! Signet non défini.

Figure 2.2. Hypothèses de co-évolution entre la plante et le pathogène. **97**

Figure 2.3. Évolution des gènes de résistance, les trois modèles d'évolution en population. **99**

Figure 2.4. Structure des *Oryzae* et flux de gènes entre génomes. **103**

Figure 2.5. Structure des *Oryza sativa*. **10**Erreur ! Signet non défini.

Figure 2.6. Diversité moléculaire au niveau de la zone de *Pi33*, données de Romain Berruyer (2003). **105**

Figure 2.7. Résultats du génotypage de 21 variétés à l'aide de marqueurs SSR. **120**

Figure 2.8. Résultats du génotypage de 20 variétés à l'aide de marqueurs SSR. **120**

Figure 2.9. Origine du bras court du chromosome 8 dans quatre variétés de riz. **122**

Figure 2.10. Arbre de répartition des données de la core-collection d'*Oryza sativa*. **122**

Figure 2.11. Distribution de *Pi33* au sein des espèces sauvages. **124**

Figure 2.12. Symptômes sur *Oryza rufipogon* IRGC101508. **126**

Figure 2.13. *Oryza rufipogon*. **126**

Figure 2.14. Symptômes sur *Oryza latifolia* W1184. **126**

Figure 2.15. *Oryza latifolia* W1184. **126**

Figure 2.16. Distribution des différents allèles *ACE1* au niveau mondial. **134**

Figure 2.17. Échelle de notation. **136**

Figure 2.18. Exemples de résultats issus des tests de résistance. **136**

Figure 3.1. Les grandes classes de protéines codées par les gènes de résistance des plantes. **140**

Figure 3.2. Modèle d'activation des NBS–LRR. **145**

Figure 3.3. Répartitions des RGA sur de chromosome du Riz. **147**

Figure 3.4. Évolution des gènes de résistance organisés en cluster. **149**

Figure 3.5. Modèle d'évolution du cluster *Xa21*. **151**

Figure 3.6. Analyse comparative du locus *Pi2/9* dans cinq variétés. **151**

Figure 3.7. Cartographie physique chez IR64. 154
Figure 3.8. Annotation du locus *Pi33* dans la variété japonica Nipponbare. 157
Figure 3.9. Structure comparative du locus *Pi33* dans trois variétés. 157
Figure 3.10. Profil de restriction des clones BAC identifiés au niveau du cluster *Pi33*. 158
Figure 3.11. Cartographie du locus *Pi33* à partir des différentes banques BAC. 158
Figure 3.12. Annotation de la fin du locus *Pi33*. 160
Figure 3.13. Similarité des LRR-kinases candidates au cluster *Pi33*. 162
Figure 3.14. Pourcentage d'homologie de séquence entre les LRR-Kinases. 162
Figure 3.15. Similarité des NBS-LRR candidates au cluster *Pi33*. 164
Figure 3.16. Pourcentage d'homologie de séquence entre les NBS-LRR. 164
Figure 3.17. Structure comparative du locus *Pi33* dans différentes variétés. 166
Figure 3.18. Résultats des amplifications par long-range PCR pour le gène NB11-3,5. 166
Figure 3.20. Phénotypes des mutants de la population de Tilling IR64. 169
Figure 3.21. Phénotypes observés lors du crible de la banque de mutants C101LAC. 172
Figure 3.22. Bilan du criblage de la banque de mutants C101LAC 172
Figure 3.23. Polymorphisme de séquence dans le mutant 5426 172
Figure 3.24. Hypothèse d'évolution des analogues de gène de résistance du locus *Pi33*. 177
Figure 3.25. Schéma de la sélection phénotypique des mutants C101LAC. 186
Figure 3.26. Plan de sous-clonage des clones BAC 33B02 et 44H23. 189
Figure 4.1. Schéma des réactions de défense. 193
Figure 4.2. Les différents types de réponses induites par le système de défense des plantes. 197
Figure 4.3. Points communs entre le système de défense basal et la HR. 203
Figure 4.4. Annotation des gènes différentiellement exprimés lors de l'interaction gène-pour-gène *Pi33/ACE1*. 223
Figure 4.5. Cinétique d'expression pour les sept gènes issus de l'expérience « B8 » 228
Figure 4.6. Arbre des cinétiques d'expression 235
Figure 4.7. Symptômes obtenus sur les variétés utilisées. 235
Figure 4.8. Hybridations sur puces à ADN. 239

Table des tableaux

Tableau 1.1. Gènes d'avirulence fongiques clonés. 30
Tableau 1.2. Gènes de résistance à la pyriculariose clonés. 78
Tableau 2.1. Diversité nucléotidique et Ka/Ks de quelques gènes de résistance. 97
Tableau 2.2. Résultats des tests de Résistance. 124
Tableau 2.3. Résultats des expériences de Rose *et al.*, 2005. 130
Tableau 3.1. Quelques exemples de gènes organisés en Cluster. 147
Tableau 3.2. Polymorphisme de séquence (codant + non-codant) au sein des différents gènes candidats. 168
Tableau 3.3. Polymorphisme de séquence (codant + non-codant) au sein des différents gènes candidats entre les deux variétés de référence Nipponbare et 93-11. 168
Tableau 3.4. Expression des gènes candidats au cours de l'infection. 169
Tableau 3.5. Bilan des complémentations de clones BAC entiers. 173
Tableau 3.6. Bilan sur la sélection de gènes candidats pour *Pi33*. 179
Tableau 4.1. Les protéines PR chez le riz. 199
Tableau Supplementaire S1 Origin of the 14 knon and putative rice genes required for disease resistance. 209
Tableau Supplémentaire S2 Origin of the rice defence gene list. 209
Tableau Supplémentaire S3 QPCR primers. 211
Tableau 4.2. Schéma récapitulatif des conditions expérimentales et des différentes comparaisons. 221
Tableau 4.3. Bilan des gènes identifiés dans la littérature et par analyse de transcriptome. 221
Tableau 4.4 : Bilan des 47 gènes différentiellement exprimés dans l'expérience « B8 » et sélection des 21 gènes dont le profil d'expression doit être validé en QPCR. 225
Tableau 4.5. Profil d'expression des 34 gènes sélectionnés. 228
Tableau 4.6. Sélection de sept gènes pour une comparaison des profils d'expression dans différentes conditions incompatibles. 231
Tableau 4.7. Profil d'expression de sept gènes lors de différentes interactions incompatibles. 233
Tableau 4.8. Influence de l'inoculum sur l'expression de gènes de défense. 233
Tableau 4.9. Pourcentage d'homologie entre les profils d'expression. 235

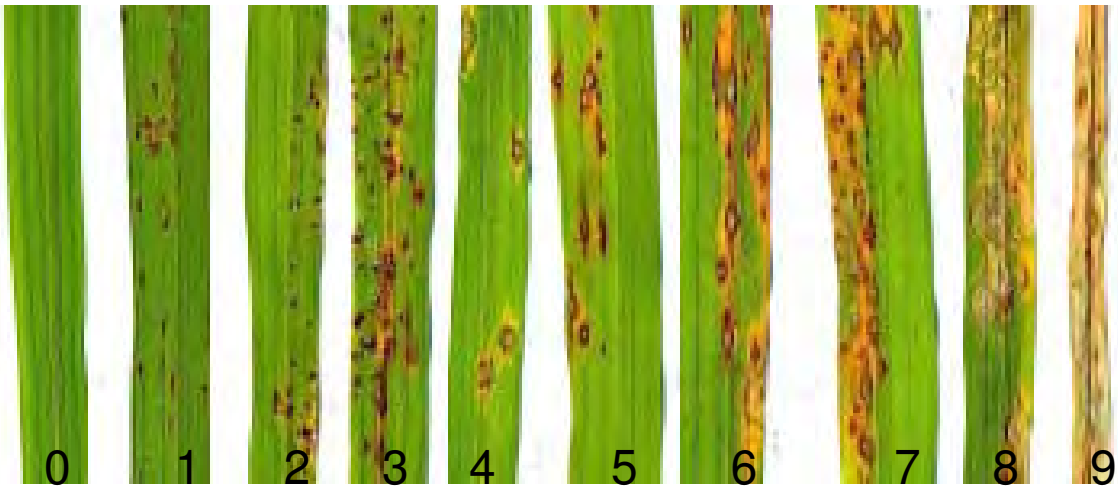


Figure 1.1. Illustration des symptômes de résistance complète, partielle et sensibilité.

Échelle de notation adaptée de l'IRRI (International Rice Research Institute). 0 = plante résistante, 1-2 = symptôme de HR sur plante résistante, 3 à 8 = différents niveaux de résistance partielle, 9 = sensibilité maximale et mort de la plante.

I Introduction

I.1 Les interactions des plantes avec les agents pathogènes

I.1.1 Quelques définitions

Certains termes relatifs à la pathologie végétale entraînent souvent des confusions. Ainsi, il peut être nécessaire dans un premier temps de revenir sur quelques définitions simples qui seront celles que nous utiliserons dans la suite de ce document.

Les **interactions non hôtes** concernent les cas où une espèce pathogène est incapable d'infecter une espèce de plante. La résistance non hôte se traduit par la mise en œuvre de mécanismes tels que les défenses de base des plantes (dépôts de callose, saponines…), mais aussi la reconnaissance d'éliciteurs généraux comme la flagelline des bactéries (Mysore et Ryu, 2004). Les phénotypes peuvent être une absence totale de lésion ou des petites lésions nécrotiques de type Réponse Hypersensible (HR).

Les **interactions hôtes,** sont celles où certains individus d'une espèce pathogène sont capables d'infecter au moins certains individus d'une espèce de plante. Dans ce cas, on distingue les interactions compatibles des interactions incompatibles. Lors d'une **interaction compatible**, des symptômes caractéristiques de la maladie se développent car la plante détecte trop tardivement l'infection pour pouvoir la stopper. La plante dans ce cas est plus ou moins **sensible** (Figure 1.1). Dans certains cas, des mécanismes de défenses de base des plantes peuvent être mis en place et entraîner une **résistance partielle** de la plante (Parleviet et Ommeren, 1975). Au contraire, les **interactions incompatibles** impliquent une reconnaissance précoce de l'agent pathogène par la plante qui arrive ainsi à stopper l'invasion de l'agent pathogène en activant ses réactions de défense. La plante présente alors une **résistance complète**.

La **virulence** est un terme qualitatif qui rend compte de la capacité d'un agent pathogène à attaquer un hôte. L'**avirulence** est un terme utilisé pour désigner les agents pathogènes qui ne peuvent infecter une plante du fait de leur reconnaissance précoce par la plante. Nous utiliserons les termes virulence et avirulence dans un cadre plus étroit qui est celui de la théorie gène-pour-gène.

L'**agressivité** est un terme utilisé pour désigné de manière quantitative l'efficacité avec laquelle un agent pathogène peut provoquer des dommages plus ou moins importants.

Une résistance peut être qualifiée de **spécifique** lorsqu'elle permet la résistance à certaines souches de l'agent pathogène mais pas à toutes. Au contraire, la **résistance non spécifique** est efficace vis-à-vis de toutes les souches (Jorgensen, 1987).

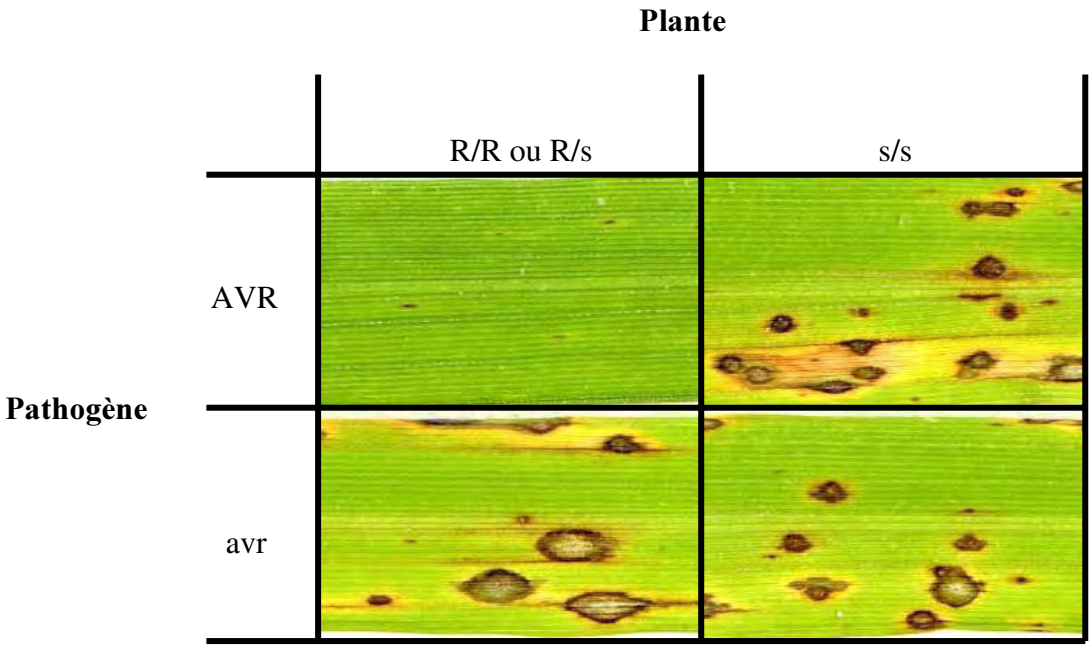


Figure 1.2. Schématisation de la relation gène-pour-gène définie par Flor (1973).
En présence des deux allèles dominants d'avirulence *AVR* et de résistance *R*, l'interaction est incompatible et entraîne un phénotype de résistance de la plante. Si au moins un des deux gènes est l'allèle récessif *avr* ou *s*, l'interaction est compatible et le phénotype de la plante sensible.

Les plantes sont soumises à de nombreux stress abiotiques et biotiques. Pour se défendre contre ces agresseurs, elles ont développées des systèmes de défense complexes. Elles ont ainsi acquis des résistances à des agents pathogènes très divers : virus, bactéries, champignons, nématodes, insectes. A l'instar du système immunitaire des animaux, elles ont acquis la capacité de reconnaître spécifiquement leurs agresseurs et de fournir une réponse ciblée et adaptée.

I.1.2 La relation gène-pour-gène

a Enoncé de la théorie gène-pour-gène

La théorie gène-pour-gène a été énoncée par Flor en 1956. Elle est basée sur la démonstration de l'existence de résistances spécifiques, monogéniques et dominantes dans l'interaction entre le lin et le basidiomycète *Melampsora lini*. Selon cette théorie, les résistances spécifiques sont dues à des gènes de résistance (gènes R), auxquels correspondent des gènes d'avirulence chez l'agent pathogène (Figure 1.2). Lorsqu'un organisme pathogène avirulent (Avr) infecte une plante résistante (R), la réaction est dite incompatible, et l'organisme pathogène ne se développe pas. Si l'un ou l'autre de ces gènes ou les deux gènes sont absents, l'agent pathogène peut se développer, et les symptômes de la maladie sont observés. Cette théorie sera ensuite étendue à de nombreuses autres interactions plante/agent pathogène (Flor, 1971 ; Day, 1974 ; Thompson et Burdon, 1992 ; Keen, 1990 ; De Witt, 1992) dont l'interaction riz/*Magnaporthe oryzae* (Silué *et al.*, 1992)

Bien que cette théorie semble être la règle dans la plupart des interactions, la mise en évidence d'interactions plus complexes a entraîné dans certains cas une adaptation de la théorie gène-pour-gène. Ainsi, certains produits de gènes d'avirulence peuvent être reconnus par plusieurs gènes de résistance. C'est le cas de *AvrB* qui est reconnu par *RPM1* chez *Arabidopsis thaliana* et *RPG1-b* chez le soja (Ashfield *et al.*, 2004). Dans d'autres cas, des gènes de résistance reconnaissent deux gènes d'avirulence. Ainsi, *RPM1* reconnaît non seulement *AvrRPM1* mais aussi *AvrB* (Debener *et al.*, 1991 ; Bisgrove *et al.*, 1994), et *Pto* reconnaît *AvrPto* et *AvrPtoB* (Kim *et al.*, 2002). Ces résultats sont en accord avec le fait que les plantes, bien que présentant un nombre limité de gènes de résistance, sont capables de reconnaître un grand nombre d'agents pathogènes. Par ailleurs, bien que les études génétiques réalisées aient fréquemment montré le caractère dominant du gène de résistance, certains gènes de résistance sont récessifs comme par exemple *xa5* (Iyer et McCouch, 2004), *xa13* (Chu *et al.*, 2006) et *rrs1*R (Deslandes *et al.*, 2002). Si dans le cas de *rrs1*R une interaction classique gène-pour-gène a été démontrée (Deslandes *et al.*, 2003), les mécanismes des interactions impliquant *xa5* et *xa13* seraient plus complexes (Kottapalli *et al.*, 2007).

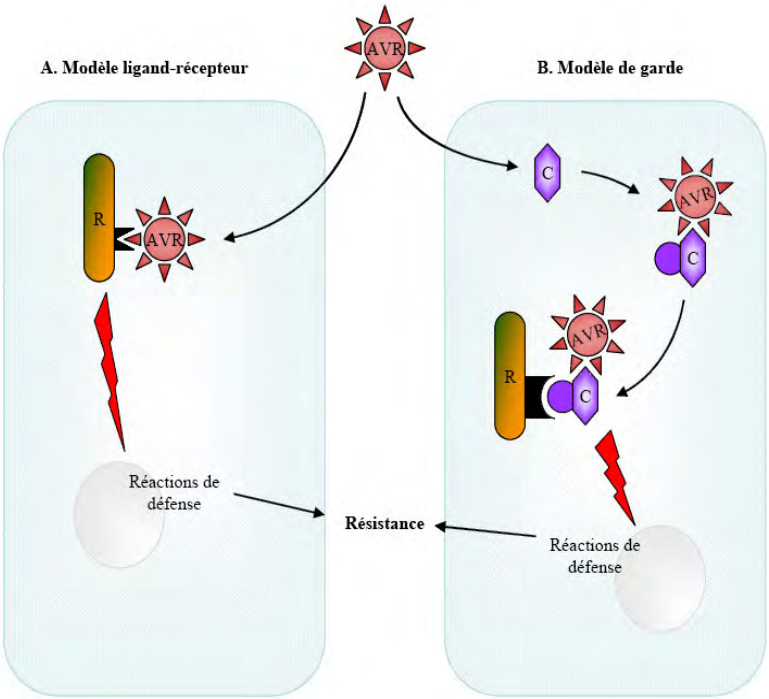


Figure 1.3. Modèles biochimiques de la relation gène-pour-gène.
Schéma fournis par J. Collemare.
A. La protéine de résistance R est un récepteur sur lequel se fixe la protéine d'avirulence AVR. L'interaction déclenche une cascade de signalisation aboutissant à l'activation des réactions de défense.
B. La protéine AVR se fixe sur une protéine cible C, interaction qui peut induire un changement de conformation et la reconnaissance consécutive par le récepteur R. Cette interaction *via* la protéine C conduit à l'activation des réactions de défense.

Toutes ces exceptions pourraient être le signe que la théorie gène-pour-gène est trop simple pour rendre complètement compte d'une réalité qui est probablement plus complexe. D'autres formes d'interactions ne sont donc pas exclues. Sur la base de la démonstration de la théorie gène-pour-gène, une cinquantaine de gènes R et plusieurs gènes AVR ont été clonés (Martin *et al.*, 2003). Les différents types de gènes R seront détaillés dans le chapitre 2 (Paragraphe III-1-1-a). A partir de la caractérisation des protéines issues de ces gènes clonés (Holub, 2001 ; Dangl et Jones, 2001 ; Nimchuk *et al.*, 2003), deux grands types de gènes de résistance peuvent être identifiés en fonction de leur localisation cellulaire : les protéines membranaires (parmi lesquelles les LRR-kinases) et les protéines cytoplasmiques (parmi lesquelles les protéines à Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat ou NBS-LRR).

b Interprétation biochimique de la théorie gène-pour-gène

Suite à l'énoncé de la théorie gène-pour-gène, plusieurs interprétations biochimiques ont été proposées. La première interprétation, la plus simple, propose une interaction directe entre un récepteur codé par le gène R et son ligand codé par le gène AVR (Figure 1.3) (Keen, 1982 ; Garbriel et Rolfe, 1990). La fixation du produit du gène AVR sur le produit du gène R initierait une cascade de signalisation conduisant à l'activation des réactions de défense et l'induction d'une mort cellulaire programmée (HR). Ce modèle a été proposé à partir de l'observation de domaines d'interaction protéine-protéine dans les produits des gènes de résistance. Il implique une colocalisation des produits des gènes de résistance et d'avirulence. Par exemple, *Cladosporium fulvum* est un champignon qui croît dans l'apoplasme des tissus végétaux où il sécrète des signaux d'avirulence. Les protéines de résistance correspondantes, codées par les gènes Cf, sont ancrées dans la membrane plasmique, ce qui suggère qu'une interaction directe avec la protéine d'avirulence serait possible. Cependant, une interaction directe entre les produits des gènes de R et d'AVR n'a pu être mise en évidence que dans cinq cas. Dans le pathosystème riz/*M. oryzae*, le produit du gène *AvrPita* de *M. oryzae* est reconnu directement par le récepteur NBS-LRR Pita du riz en interagissant avec son domaine LRR (Jia *et al.*, 2000). Dans le pathosystème lin/*M. lini*, le gène d'avirulence polymorphe *AVRL567* produit un peptide reconnu dans la plante directement par les produits des gènes de résistance de type NBS-LRR *L5*, *L6* et *L7* (allèles du gène *L*) (Dodds *et al.*, 2006). Dans le pathosystème tabac/TMV le gène de résistance *N* de type TIR-NBS-LRR reconnaît de manière spécifique la protéine p50 du domaine hélicase du virus (Burch-Smith *et al.*, 2007). Dans le pathosystème tomate/*Pseudomonas syringae* une interaction directe entre la kinase Pto et le produit du gène d'avirulence *AvrPto* a également été démontrée (Tang *et al.*, 1996). Enfin chez les bactéries, la cystéine protéase PopP2 de *Ralstonia solanacearum* se fixe sur le récepteur TIR-NBS-LRR-WRKY codé par le gène de résistance récessif *RRS1*-R d'*A. thaliana*

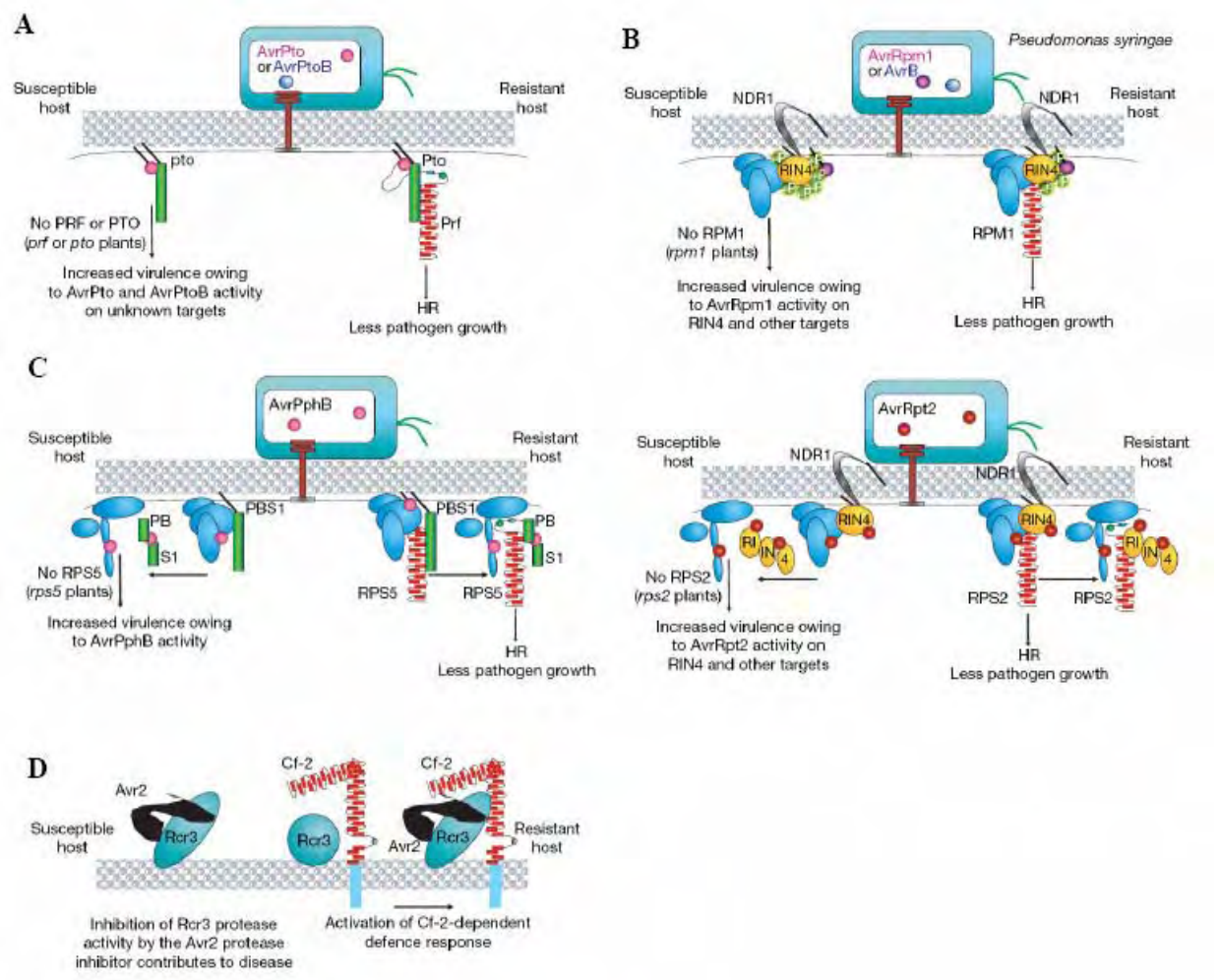


Figure 1.4. Reconnaissance spécifique des plantes par leurs protéines de résistance R, *via* l'interaction avec une troisième protéine cible de la protéine d'avirulence AVR.
(d'après Jones et Dangl, 2006)
A. Pto est une sérine-thréonine kinase de la tomate, cible de deux effecteurs de *Pseudomononas syringae* non apparentés AvrPto et AvrPtoB qui contribuent à la pathogénie de la bactérie. La kinase Pto est gardée par la protéine NBS-LRR Prf.
B. RIN4 chez *Arabidopsis thaliana* est la cible de plusieurs effecteurs de *P. syringae* : AvrRpm1, AvrB et AvrRpt2. L'intégrité de RIN4 est gardée par deux protéines NBS-LRR, RPM1 et RPS2. RPM1 est activé en réponse à la phosphorylation de RIN4, alors que RPS2 est activé par la dégradation de RIN4 par AvrRpt2, une cystéine protéase.
C. PBS1 est une sérine-thréonine kinase d'*A. thaliana* qui est clivée par la cystéine protéase AvrPphB de *P. syringae*. Cette dégradation est détectée par la protéine NBS-LRR RPS5 localisée au niveau de la membrane. L'activité catalytique de PBS1 clivée est indispensable à l'activation de RPS5.
D. La protéine R Cf-2 de tomate garde la cystéine protéase extracellulaire Rcr3. Avr2, produite par *Cladosporium fulvum*, est une protéine inhibitrice des cystéine protéases qui empêche le bon fonctionnement de Rcr3. Des mutations dans Rcr3 conduisent à l'absence de reconnaissance par Cf-2. Cette protéine reconnaît le complexe Avr2-Rcr3 où Rcr3 a subit un changement.

(Deslandes *et al.*, 2003). De manière surprenante, ce n'est donc que dans le cas d'interaction intracellulaire qu'une interaction directe a pu être démontrée. En effet, les tentatives pour démontrer le modèle ligand-récepteur dans les autres cas n'ont pas abouti, notamment dans le cas de l'interaction tomate/*C. fulvum*, *Cf-9*/*Avr9* (Luderer *et al.*, 2001).

Une interprétation biochimique alternative ne faisant pas intervenir d'interaction directe avec le ligand a été proposée au travers de l'hypothèse de garde (Van der Biezen et Jones, 1998 ; Dangl et Jones, 2001). Cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi la protéine kinase Pto a besoin de la présence de la protéine NBS-LRR Prf pour activer la réaction de défense en présence d'*AvrPto*. Selon ce modèle, Pto est une composante générale de la réaction de défense de l'hôte. L'effecteur bactérien AvrPto aurait pris pour cible Pto afin de supprimer cette voie de défense non spécifique. Prf serait alors une protéine NBS-LRR qui «garderait» Pto, c'est-à-dire qui détecterait son blocage par AvrPto et activerait alors une réaction de défense de type HR. Cette théorie dite « de garde » a été démontrée dans plusieurs cas, et notamment dans le pathosystème *A. thaliana*/*P. syringae* où les gènes d'avirulence *AvrRpm1*, *AvrB* et *AvrRpt2* ont pour cible, entre autres la protéine RIN4 (Mackey *et al.*, 2002 ; Mackey *et al.*, 2003 ; Belkhadir *et al.*, 2004) qui interagit avec les gènes de résistance *Rpm1* et *Rps2*. RIN4 régule négativement ces deux récepteurs, et aurait également un rôle dans le système de défense basal de la plante (Kim *et al.,* 2005). Ainsi, RIN4 est gardée par deux récepteurs différents : RPM1 détecte sa phosphorylation (Mackey *et al.*, 2002) et RPS2 détecte sa dégradation (Mackey *et al.*, 2003) (Figure 1.4). D'autres démonstrations de l'hypothèse de garde ont été proposées (Figure 1.4) toujours dans le pathosystème *A. thaliana*/*P. syringae* avec le couple *Rps5*/*AvrPhpB* et la protéine cible impliquée dans les voies de défense PBS1 (Shao *et al.*, 2003), ainsi que dans le pathosystème tomate/*C. fulvum* et les couple *Cf2*/*Avr2* avec la protéine cible RCR3 (Rooney *et al.*, 2005) et *Cf4*/*Avr4* et la NBS-LRR NRC1 (Gabriëls *et al.*, 2007). Une généralisation de ce modèle serait que les protéines R interagiraient physiquement avec les cibles des effecteurs de l'agent pathogène. Ces cibles peuvent être des composants de la résistance, ou bien des protéines de la plante dont la fonction serait modifiée pour permettre à l'agent pathogène d'envahir son hôte. En interagissant avec cette cible, l'effecteur pathogène provoquerait des modifications conformationnelles qui seraient détectées par la protéine de résistance et induirait ainsi son activation (figure 1.4). En l'absence de la protéine de résistance, l'interaction entre la protéine cible et l'effecteur ne serait pas détectée, et la maladie s'installerait.

Suite à ces observations, différentes adaptations de la théorie de garde sont possibles (Martin *et al.*, 2003). Dans un premier scénario, la protéine R serait constitutivement liée à «sa protégée», et s'en séparerait après liaison à un effecteur qui provoquerait alors son activation. Ce

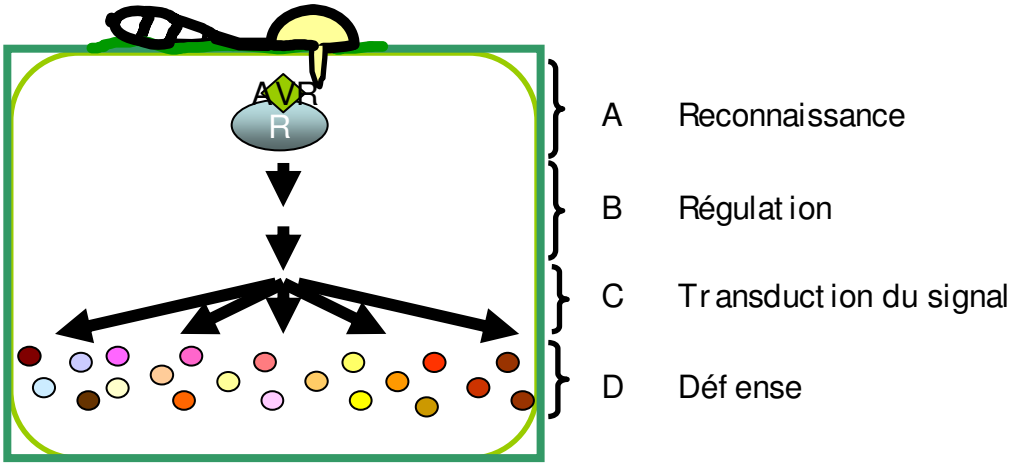


Figure 1.5. Schéma des différentes phases du système de défense de la plante.

A = phase de reconnaissance (spécifique par les gènes de résistance ou non spécifique par les récepteurs membranaires). B = phase de régulation comportant quelques régulateurs clefs (SA, JA, ET, ...) C phase de transduction par différents effecteurs. C = Déclenchement des défenses de la plante (Protéines de défense, mort cellulaire, ...).

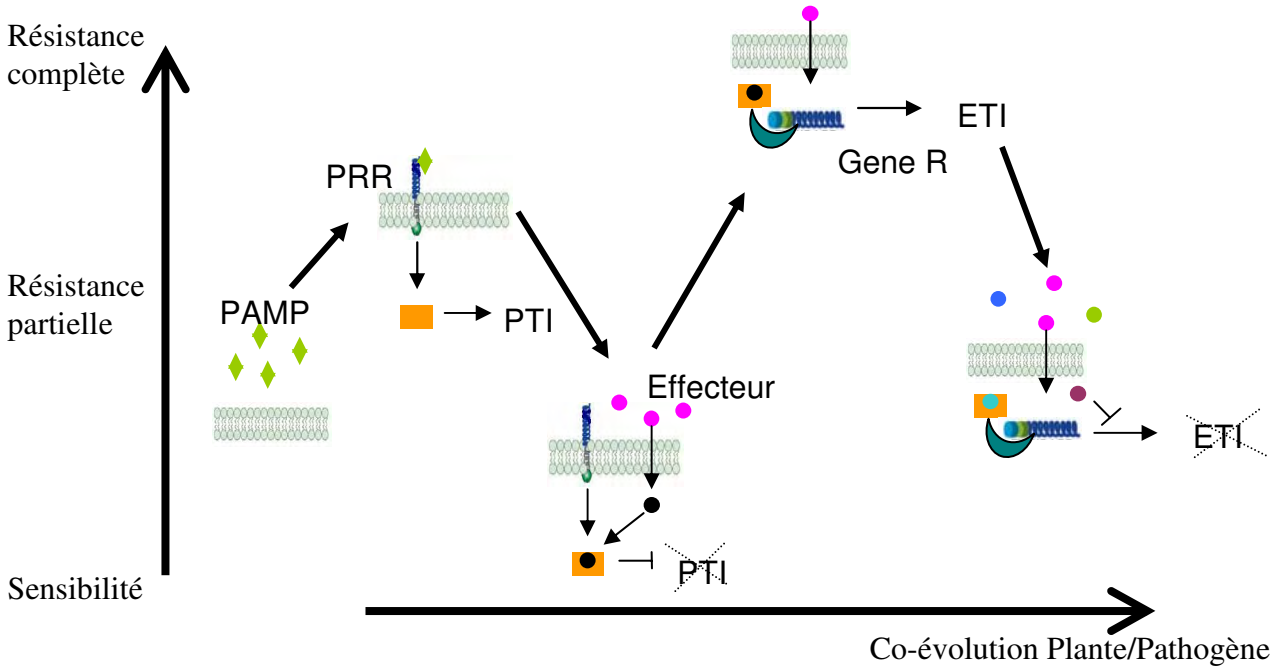


Figure 1.6. Schéma de co-évolution entre résistance des plantes et pathogénie des agents pathogènes.

(Adapté de Jones et Dangl., 2006 et Bent et Mackey, 2007)

Au début, la plante détecte des éliciteurs généraux PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) via des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) pour conférer la résistance basale PTI (PAMP-Triggered Immunity). Ensuite, certains agents pathogènes sont capables d'injecter des effecteurs dont certains interfèrent avec la PTI, conduisant à la sensibilité. Un de ces effecteurs est alors reconnu indirectement ou non par un gène R de résistance, activant une réaction de défense amplifiée ETI (Effector-Triggered Immunity) qui induit une résistance complète. L'agent pathogène peut de nouveau provoquer la maladie en perdant l'effecteur reconnu et/ou en acquérant de nouveaux effecteurs qui peuvent interférer avec l'ETI. De nouvelles reconnaissances seront ensuite favorisées pour la résistance de la plante.

scénario implique une inhibition, par la « protégée », de la protéine de résistance elle-même et de la voie de signalisation qui la suit. Dans ce cas, la surexpression de la protéine de résistance conduit à une résistance constitutive. Dans un autre scénario, la protéine R est libre et l'action de l'effecteur sur la protégée entraîne une modification de sa conformation que la protéine R reconnaît. La liaison de cette dernière avec le complexe activerait la réaction de défense.

c Intégration de la reconnaissance spécifique dans le système de défense

La reconnaissance spécifique par l'intermédiaire des gènes de résistance n'est qu'une composante du système de défense des plantes contre les agents pathogènes. Ce système se compose de quatre niveaux (Figure 1.5). Un premier niveau de reconnaissance dont font partie les gènes de résistance, un deuxième niveau de régulation, un troisième niveau de transduction du signal et enfin un dernier niveau où les gènes de défense à proprement parler s'expriment. Ces différents niveaux du système de défense vont être déclenchés quelque soit l'agent pathogène de manière généraliste ou spécifique (voir Chapitre IV-1-1).

Un modèle a été proposé pour illustrer la co-évolution entre les systèmes de virulence d'un agent pathogène et le système de défense de la plante : le modèle en zigzag (Jones et Dangl, 2006) (Figure 1.6). Lors d'une attaque, un premier système de reconnaissance des plantes par l'intermédiaire des PRR (Pattern Recognition Receptor) conduit à la reconnaissance de composés spécifiques des grandes classes de microorganismes : bactéries, champignons. Ces éliciteurs généraux appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) vont avoir différentes fonctions, dont un rôle dans le pouvoir pathogène. Ils ne sont pas spécifiques d'une espèce ou d'un individu. Les PRR sont capables de reconnaître les PAMP de manière spécifique et induisent la résistance basale appelée PTI (PAMP-Triggered Immunity). L'agent pathogène sécrète alors des effecteurs spécifiques dont certains vont avoir pour fonction de supprimer le système de défense basal de la plante. Dans un second temps, le deuxième niveau de reconnaissance se met en place *via* les gènes de résistance. Des gènes de résistance sont capables de reconnaître directement ou non les effecteurs de l'agent pathogène ou le disfonctionnement du système de résistance basale. Ils vont alors induire une ETI (Effector-Triggered Immunity). Dans les deux cas, la PTI et l'ETI vont induire des régulateurs qui eux-mêmes vont enclencher une cascade d'activation qui aboutira au déclenchement de la résistance, sauf si l'agent pathogène a déjoué ce système de défense.

Ce modèle est illustré dans l'interaction entre la tomate et *P. syringae* (Martin *et al.*, 2007). Dans ce pathosystème, un éliciteur PAMP serait produit par la bactérie et serait ensuite reconnu par une PRR qui induirait une résistance basale de type PTI. Un premier effecteur, AvrPto, serait apparu pour inhiber la défense basale. La plante aurait alors mis en place une protéine de garde

RsB (probablement produite par le gène *Fen*) qui induit une résistance complète par ETI. Le gène *RsB* est d'ailleurs relativement fréquent chez les espèces de tomate sauvage (57%) ce qui pourrait confirmer son origine ancienne. La bactérie aurait contourné cette première résistance en mettant en place un deuxième éliciteur AvrPtoB qui prendrait RsB comme cible. Mais le gène de résistance *Pto* de la tomate serait capable de détecter les modifications induites par AvrPtoB sans être neutralisé et déclencher ainsi une HR. Ainsi, *Pto* serait plus récent que *Rsb*, et n'est d'ailleurs présent qu'à 22% dans les populations de tomate sauvage. On a donc un exemple de coévolution au cours de laquelle l'agent pathogène doit acquérir de nouvelles fonctions enzymatiques pour pouvoir contourner ou neutraliser le système de défense de la plante.

Le système de défense des plantes est particulièrement étudié car il soulève de nombreux enjeux scientifiques et économiques. Dans ce cadre, plusieurs interactions se sont distinguées comme modèles des interactions plante/agent pathogène. On peut citer, par exemple, les modèles *A. thaliana*/*P. syringae* et tomate/*C. fulvum*. Mais ces deux modèles très étudiés impliquent des dicotylédones. Chez les monocotylédones, le pathosystème riz/*M. oryzae* est le modèle d'interaction (Veneault-Fourrey et Talbot 2005).

I.2 Présentation du pathosystème

I.2.1 Le riz, plante agronomiquement importante

Le riz (*Oryza sativa* L.), au même titre que le blé, est une culture ancienne. Le riz est essentiellement cultivé dans des pays au climat chaud et humide mais son aire de culture s'étend entre 40° de latitude sud et 53° de latitude nord. Il se développe dans un très large éventail de milieux en termes de topographie, type de sol, régime hydrique, altitude et facteurs climatiques. Les conditions d'environnement dans lesquelles le riz est cultivé sont généralement classées en fonction du régime hydrique. La riziculture est dite irriguée lorsqu'il y a submersion avec contrôle de l'eau, et inondée dans le cas contraire. Lorsqu'il n'y a pas submersion pendant la culture, la riziculture peut être strictement pluviale (Arraudeau, 1998).

Si la production en France reste anecdotique avec 102 000 tonnes pour 23 000 ha cultivés principalement en Camargue et en Guyane, le riz compose l'alimentation de base de plus de trois milliards d'être humains, principalement en Asie où 90% de la production est réalisée. La production de riz atteignait 602 millions de tonnes en 2006 pour une surface cultivée de 152 millions d'hectares (sources Rice Facts, IRRI). Le riz est donc d'une très grande importance alimentaire, mais aussi économique.

Figure 1.7. Symptômes et dégâts provoqués par *Magnaporthe oryzea* sur la culture de riz.
Symptômes sur panicules et dégâts au champ en Camargue.
Photos : D. Tharreau

I.2.2 *Magnaporthe oryzae* agent causal de la pyriculariose

a Symptômes et dégâts

La pyriculariose est une maladie des organes aériens du riz (feuilles, tiges et panicules). Les symptômes foliaires débutent par l'apparition de lésions blanchâtres qui évoluent vers des lésions nécrotiques en forme de losange dont le centre est grisâtre et les bords bruns (Figure 1.7). Dans le cas d'attaques sévères sur des individus très sensibles, les lésions peuvent fusionner et provoquer la mort de la feuille (Figure 1.7). Ces lésions entraînent la diminution de l'activité photosynthétique des feuilles, ce qui a pour conséquence une baisse du tallage, de la hauteur des plantes, puis finalement du nombre de grains et de leur poids, et donc conduit à une baisse importante du rendement (Bastiaans, 1991, Goto, 1965, Prabhu & De Faria, 1982) (Figure 1.7). Les nœuds, la tige, les semences et la panicule peuvent également être attaqués. Cette dernière forme de la maladie est la plus dommageable pour les cultures car elle empêche le remplissage des grains, ce qui a des conséquences directes sur le rendement, mais aussi sur la qualité de la récolte (Katsube & Koshimizu, 1970).

La pyriculariose du riz est présente dans toutes les zones où cette plante est cultivée (Ou, 1985). Cette maladie peut être particulièrement destructrice dans certaines conditions. Une culture en situation irriguée avec de forts intrants azotés est notamment favorable à son développement (Teng *et al.*, 1991 ; Bastiaans, 1991). Les riz en culture pluviale sont particulièrement sensibles à la maladie. En revanche, les riz irrigués en conditions tempérées et les riz cultivés en altitude sont moins sujets à cette maladie. Les pertes de rendement provoquées par la pyriculariose sont très variables en fonction des agrosystèmes. Elles peuvent atteindre 100% dans certaines conditions environnementales et pratiques culturales (Khush, 1989 ; Vera Cruz *et al.*, 2007).

b Biologie de *Magnaporthe oryzae*

L'agent responsable de la pyriculariose est un champignon filamenteux Ascomycète de type pyrénomycète. C'est sous sa forme asexuée (*Pyricularia oryzae* Cavara) qu'il a été décrit pour la première fois en 1891. La forme sexuée (*Magnaporthe oryzae* (Hebert, Barr)) n'a jamais été observée dans la nature. Elle a été obtenue pour la première fois au laboratoire en croisant deux isolats de *Pyricularia grisea* pathogènes de *Digitaria sanguinalis* (Hebert, 1971). Les espèces du genre *Magnaporthe* sont capables de provoquer des lésions sur au moins 65 espèces de 33 genres de monocotylédones différents (Nukina, 1998).

Ce champignon présente sur milieu de culture un mycélium constitué de filaments cloisonnés dont les articles possèdent un seul noyau haploïde. Ce mycélium peut produire des

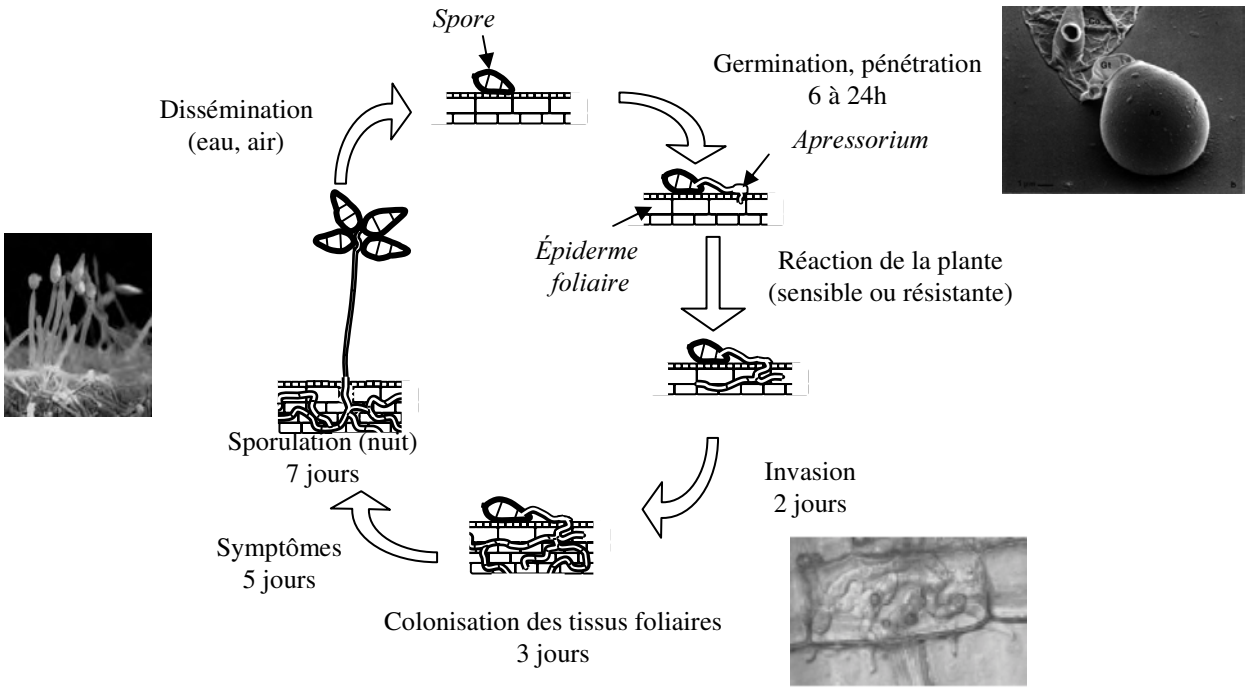


Figure 1.8. Cycle infectieux de *Magnaporthe oryzæ*.
(D'après R. Berruyer)
L'adhésion des spores à la surface hydrophobe des feuilles est réalisé par un mucilage riche en glycoprotéines. La spore germe rapidement et différencie une structure spécialisée dans la pénétration, l'appressorium. Celui-ci accumule une forte pression osmotique permettant la pénétration mécanique des tissus végétaux. Les hyphes secondaires colonisent ensuite les tissus durant une phase de biotrophie. Vers 5 jours après le début de l'infection, des lésions apparaissent correspondant au passage du champignon à une vie nécrotrophe. Les lésions deviennent sporulantes et les conidies sont dispersées, à l'origine des cycles secondaires de la maladie.

conidiophores portant des bouquets de conidies, les organes de multiplication asexuée du champignon. Lorsque ces conidies sont libérées, elles peuvent se fixer sur des surfaces hydrophobes (dans la nature, des cuticules de feuilles) grâce à un mucilage glycoprotéique adhésif (Hamer *et al.*, 1988). Dans les conditions environnementales favorables, la spore produit un tube germinatif qui arrête rapidement sa croissance (2h) pour se différencier en une cellule spécialisée dans la pénétration, l'appressorium (6h) (Wang *et al.*, 2005) (Figure 1.8). Commence alors une phase de maturation (8h) durant laquelle l'appressorium est rendu imperméable aux solutés tout en restant perméable à l'eau grâce à la mélanisation de sa paroi ; le cytosquelette quand à lui se réorganise (Park *et al.*, 2004). La pénétration mécanique directement à travers la cuticule et la paroi des cellules végétales (8-12 h) est réalisée par la formation d'un hyphe de pénétration et grâce à la forte pression osmotique développée dans l'appressorium. Le champignon colonise ensuite rapidement les tissus végétaux dans une phase de biotrophie en différenciant des hyphes secondaires globuleux qui semblent passer d'une cellule à l'autre par les plasmodesmes (Kankanala *et al.*, 2007). La phase de nécrotrophie ne débute que quelques jours plus tard, concomitante avec l'apparition des premières lésions (5 jours). Le maximum de sporulation (2 000 à 6 000 spores par lésion et par jour) est atteint 7 à 10 jours après le début de l'infection (Kato, 1974), mais les lésions continuent de produire des spores pendant au moins 15 jours. Les spores sont dispersées par la pluie et le vent, en majorité sur des distances inférieures à 3 mètres (Suzuki, 1975 ; Notteghem et al., 1977 ; Ou, 1985). Un cycle infectieux foliaire peut être réalisé en moins de 7 jours dans les conditions les plus favorables (Figure 1.8).

c Lutte contre la pyriculariose

Du fait du coût élevé des traitements, la lutte chimique contre *M. oryzae* n'est rentable que dans les zones de production où le riz est cultivé sur de grandes surfaces (Amérique du Nord et du Sud) et dans les pays où cette céréale présente une forte valeur ajoutée (Japon, Corée du Sud, Chine). Le marché des fongicides sur le riz, représentait en 2001, 10% du marché mondial (600 millions US$ sur 6 000 millions US$), dont la moitié concernait uniquement le marché japonais (Watkins, 2003). Les fongicides les plus utilisés sont des inhibiteurs de la voie de biosynthèse de la mélanine tels que le carpropamide et le tricyclazole qui rendent les appressoria non fonctionnels. Malgré, l'utilisation intensive de ces produits depuis 20 ans l'apparition de souches résistantes reste rare (Woloshuk *et al.*, 1983 ; Howard et Ferrari, 1989, Shigyo *et al.*, 2002). Au Japon, une alternative utilisée est l'induction des défenses du riz par l'application de probenazole qui possède une activité élicitrice (Shimono *et al.*, 2003).

Les effets de diverses pratiques culturales sur la sensibilité du riz à la pyriculariose sont décrits dans la littérature. Cependant, les mécanismes qui induisent cette variation de la sensibilité

Champignon	Gène d'avirulence	Fonction protéique	Taille (nombre d'acides aminés)	Références
Cladosporium fulvum	*AVR2*	Eliciteur sécrété Inhibiteur de protéase	78	luderer *et al.*, 2002 rooney *et al.*, 2005
	AVR4	Eliciteur sécrété Protection contre les chitinases	105	joosten *et al.*, 1994 van den burg *et al.*, 2004
	AVR9	Eliciteur sécrété	28	van kan *et al.*, 1991 van den ackerveken *et al.*, 1992
	ECP2	Eliciteur sécrété Facteur de pathogénie	200	lauge *et al.*, 1998
Magnaporthe grisea	*PWL1*	Eliciteur sécrété ?	147	kang *et al.*, 1995
	PWL2	Eliciteur sécrété ?	145	kang *et al.*, 1995
	AVR1-CO39	Eliciteur sécrété ?	30	farman et leong, 1998
	AVR-PITA	Eliciteur sécrété Métalloprotéase	223	orbach *et al.*, 2000
	ACE1	Polycétide synthase-peptide synthétase non ribosomale	4035	bohnert *et al.*, 2004
Rhynchosporium secalis	*NIP1*	Eliciteur sécrété Phytotoxine	60	hahn *et al.*, 1993 rohe *et al.*, 1995
Fusarium oxysporum	*SIX1*	Eliciteur sécrété Facteur de pathogénie	284	rep *et al.*, 2004 rep *et al.*, 2005
Melampsora lini	*AvrL567*	Eliciteur sécrété	150	dodds *et al.*, 2004
	AvrM	Eliciteur sécrété	343-377	catanzariti *et al.*, 2006
	AvrP4	Eliciteur sécrété	95	catanzariti *et al.*, 2006
	AvrP123	Eliciteur sécrété Inhibiteur de protéase ?	117	catanzariti *et al.*, 2006
Leptosphaeria maculans	*AvrLm1*	Eliciteur sécrété ?	160	gout *et al.*, 2006
	AvrLm6	Eliciteur sécrété ?	222	fudal *et al.*, 2007
Blumeria graminis f. sp. hordei	AVR_{K1}	Eliciteur sécrété Augmente la sensibilité	177	ridout *et al.*, 2006
	AVR_{a10}	Eliciteur sécrété Augmente la sensibilité	286	ridout *et al.*, 2006

Tableau 1.1. Gènes d'avirulence fongiques clonés.

Informations fournies par J. Collemare

demeurent mal connus. De nombreuses études ont montré que la sensibilité du riz à *M. oryzae* est augmentée lors d'apports de fortes doses d'azote (Mohanty et Gangopadhyay, 1982), de phosphore (Kozaka, 1965 ; Tokunaga *et al.*, 1965) et diminuée avec l'apport de silice (Rodrigues *et al.*, 2003 ; Hayasaka *et al.*, 2005). La sensibilité du riz à la pyriculariose augmente lorsque les plantes sont soumises à des déficits hydriques (Kahn & Libby, 1958). Une adaptation de la date de semis en fonction des périodes défavorables au développement de la maladie permet de limiter l'influence de la pyriculariose. Enfin, l'enfouissement ou la destruction des pailles peuvent se révéler importants pour détruire l'inoculum primaire dans les zones où une conservation est possible dans les débris de récolte (Kozaka, 1965).

L'utilisation de cultivars résistants s'est présentée comme une alternative efficace dès 1904. Les premiers programmes d'amélioration de la résistance variétale furent initiés au Japon (Ezuka, 1979). La sélection a d'abord été basée sur le choix de lignées ayant un niveau de résistance modéré. Sans posséder une résistance totale, ces lignées réduisent les pertes. Cependant, avec l'augmentation de l'emploi de fertilisants azotés, ces résistances partielles ont été jugées insuffisantes. Dans le cadre de la révolution verte, des programmes de sélection basés sur l'introgression de gènes de résistance découverts dans des cultivars étrangers ont permis d'aboutir à des variétés présentant une résistance totale à *M. oryzae* (Takahashi, 1965). Depuis, de nombreux gènes de résistance du riz à la pyriculariose ont été recherchés dans différentes variétés. Parallèlement, plusieurs gènes d'avirulence ont été caractérisés et clonés, non seulement chez M. oryzae mais également chez d'autres agents pathogènes fongiques (Tableau 1.1)

De nombreux gènes de résistance à la pyriculariose ont déjà été caractérisés et cartographiés (Ballini *et al.*, soumis), mais seulement sept d'entre eux ont été clonés (Paragraphe I.2.4). De même, seulement cinq gènes d'avirulence de *M. oryzae* ont été clonés dont un seul correspond à un gène de résistance cloné (*Pita*). La connaissance moléculaire des interactions gène pour gène est donc limitée. En conditions naturelles, des souches virulentes apparaissent régulièrement, 2 à 6 ans après l'introduction des cultivars résistants (Kiyosawa, 1989 ; Bonman *et al.*, 1992). C'est pourquoi différentes stratégies permettant d'obtenir des résistances durables ont été proposées comme l'accumulation de gènes de résistance spécifiques (pyramiding ; Bonman *et al.*, 1992) ou encore l'accumulation de résistances partielles contrôlées par des QTL (Ramalingam *et al.*, 2003), voire l'accumulation des deux types de résistance (Bonman *et al.*, 1992). D'autres stratégies préconisent l'emploi de mélanges variétaux résistants et sensibles (Abe, 2004 ; Zhu *et al.*, 2000) et la prise en compte des populations de l'agent pathogène (lineage exclusion ; Zeigler *et al.*, 1994). Comment expliquer les faillites toujours nombreuses de la résistance ? Les populations de l'agent pathogène pourraient avoir une évolution trop rapide par rapport à la mise en place de

nouvelles résistances par les sélectionneurs. De plus, les dispositifs d'évaluation de la résistance à la pyriculariose ne permettent pas toujours de détecter de manière précoce le contournement de la résistance. Enfin, la mauvaise connaissance de la génétique de la résistance est un facteur majeur de l'échec du déploiement de certaines variétés supposées résistantes (Ou, 1985).

De nombreuses études de génétique de la résistance à la pyriculariose ont été conduites mais aucune synthèse n'était disponible. Avant d'entamer la caractérisation d'un locus de résistance, il nous a paru nécessaire de faire une revue de la littérature existante sur les gènes et QTL de résistance identifiés et cartographiés. Cette synthèse correspond au paragraphe II de l'article suivant (soumis au journal MPMI pour publication).

I.2.3 Une revue des gènes et QTLs de résistance du riz à *Magnaporthe oryzae*.

A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and QTLs provides new insights into partial and complete resistance.

Elsa Ballini[1], Jean-Benoît Morel[1], Gaétan Droc[2], Adam Price[3], Brigitte Courtois[2], Jean-Loup Notteghem[1], Didier Tharreau[1*]

[1]UMR BGPI, CIRAD-INRA-SupAgro.M, TA A54/K, 34398 Montpellier Cedex, France

[2]UMR DAP, CIRAD-INRA-UM2, TA A96/03, 34398 Montpellier Cedex, France

[3]School of Biological Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, AB24 3UU, UK

*Corresponding Author:

Didier Tharreau

UMR BGPI, CIRAD-INRA-SupAgro.M

TA A54/K, 34398 Montpellier Cedex, France

Tel: 33 4 99 62 48 39; Fax: 33 4 99 62 48 48; email: tharreau@cirad.fr

For Peer Review

Abstract:

The completion of the genome sequences of both rice and *Magnaporthe oryzae* has strengthened the position of rice blast disease as a model to study plant–pathogen interactions in monocotyledons. Genetic studies of blast resistance in rice were established in Japan as early as 1917. Despite such long-term study, examples of varieties with durable resistance are rare, partly due to our limited knowledge of resistance mechanisms. A rising number of blast resistance genes and quantitative trait loci (QTLs) have been genetically described, and some have been characterized during the last 20 years. Using the rice genome sequence, can we go now a step further towards a better understanding of the genetics of blast resistance by combining all these results? Is such knowledge appropriate and sufficient to improve breeding for durable resistance? A review of bibliographic references identified 85 blast resistance genes and *ca.* 350 QTLs, which we mapped on the rice genome. These data provide a useful update on blast resistance genes as well as new insights to help formulate hypotheses about the molecular function of blast QTLs, with special emphasis on QTLs for partial resistance. All these data are available from the OrygenesDB database (http://orygenesdb.cirad.fr/index_fr.htm).

196 words

Keywords: colocalization, defense, MetaQTLs, *Oryza sativa*.

For Peer Review

Definitions:

Many different terms have been used to describe resistance. Moreover, the same term can sometimes have different meanings and interpretations. In order to be consistent, and to limit any misinterpretation of our results, we will first provide the definitions used in this review to describe different forms of resistance:

(1) Complete and partial resistance are defined phenotypically. Pathogen reproduction is fully inhibited for a genotype with complete resistance. A partial resistance genotype allows limited pathogen reproduction, but significantly reduced when compared to a susceptible genotype.

(2) A resistance spectrum is defined according to interaction with pathogen strains. A specific resistance is effective against only some strains of the pathogen. A broad spectrum resistance is efficient against a large number, but not all, strains of the pathogen. Since we will focus only on resistance to blast, in this review we will not use broad spectrum in the sense of efficient resistance against different types of pathogens. A general resistance is effective against all strains of the pathogen. Because it is almost impossible to demonstrate that a resistance is general, it can be used as a concept but not as a measurable trait.

(3) Durable resistance is defined *sensu* Johnson (1981), i.e. “resistance that remains effective while a cultivar possessing it is widely cultivated”.

Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is the staple food of half of the world's human population (Khush, 2005). Rice blast disease, caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr, is one of the most serious diseases of this crop. Its importance can be measured using several different parameters. First, its geographic distribution is wide; rice blast is present in all rice-growing areas worldwide (CAB International, 1981). Second, yield losses can be very large; in upland conditions, complete yield loss is frequently observed, with dramatic impact on populations fed mainly on rice.

For Peer Review

Third, fungicides are often used to control rice blast and this generates additional costs in rice production. The sales of anti-blast fungicides in Japan in 2000 were estimated at 26 billion Yen (160 million Euro; Yamaguchi, 2004). In China, from 1980 to 1990, the area treated with fungicides to prevent blast increased from 2.4 to 8.9 million ha (Shen and Lin, 1994). As a consequence, independently of the rice growing system or area, breeding for resistance to blast is needed to control the disease despite the availability of effective fungicides.

With the completion of the rice (Goff et al., 2002) and *M. oryzae* (Dean et al., 2005) genome sequences, rice blast disease has strengthened its position as a model for plant–pathogen interactions in monocotyledons (Valent 1990, Veneault-Fourrey and Talbot, 2005; Ribot et al., 2007). Despite the relatively long history of genetic studies on rice resistance to blast (Takahashi, 1965), examples of varieties with durable resistance are very few (Ou, 1985), and resistance breakdown shortly after cultivation of newly released varieties is the rule. This phenomenon is due, in part, to pathogen evolution toward virulence. Reviewing breeding for resistance to blast, Ou (1985) concludes: “Some cultivars show breakdown in resistance after a few years, and others become susceptible in other geographic areas. The problem arises because of the variability in pathogenicity of the fungus, a factor which in the past has been underestimated by workers in this field.” Different strategies to breed durable resistance have been proposed to counter blast evolution. Some strategies, such as pyramiding (Bonman et al., 1992), lineage exclusion (Zeigler et al., 1994), multilines (Abe, 2004), and mixtures (Zhu et al., 2000), are based on the use of complete and specific resistance genes. Others are based on the accumulation of partial resistance (Bonman et al., 1992), a strategy thought to be more durable because it is assumed to be more general. Lastly, based on the observation that some durably resistant cultivars display complete and partial resistance (Wang et al., 1994), a strategy combining both types of resistance was proposed (Bonman et al., 1992).

For Peer Review

Since the first publication of a quantitative trait loci (QTL) analysis of rice resistance to blast (Wang et al., 1994), many such studies have been published (Table 1). The attraction of QTL research can be explained by the fact that partial resistance implies more general mechanisms and, consequently, is thought to be more durable. But, is this assumption valid? Several studies have shown that partial resistance can be specific (Bonman et al., 1989; Roumen, 1992; Talukder et al., 2004; Lopez-Gerena, 2006). Moreover, four partial resistance genes have been identified and have been described as specific: *Pif* (Yunoki et al., 1970), *pi21* (Fukuoka and Okuno, 1997), *Pb1* (Fuji et al., 1995) and *Pi34* (Zenbayashi-Sawata et al., 2002; Zenbayashi-Sawata et al., 2005). An avirulence gene corresponding to *Pi34* (Avr*Pi34*) was identified, similar to the case for complete resistance genes (Zenbayashi-Sawata et al., 2005). All these results suggest that partial resistance is sometimes specific and does not necessarily have a broader resistance spectrum than complete resistance. However, is this a general feature of partial resistance? Does this mean that partial resistance is controlled by the same genes as complete resistance? The first cloning of a gene for partial resistance to blast, *pi21*, has recently been achieved. *pi21* encodes a protein with heavy-metal-binding and proline-rich domains, but has no similarity to proteins of known function (Fukuoka et al., 2007). Thus, *pi21* does not support the hypothesis that classical resistance genes are responsible for partial resistance.

Despite the example provided by *pi21*, the question that underlies recent publications on partial resistance to rice blast remains: which types of genes are under a QTL? Some publications have demonstrated a relationship between QTLs and different types of candidate genes: biotic stress expressed sequence tags (ESTs; Wang et al., 2001), defense genes (Ramalingam et al., 2003; Wen et al., 2003), and resistance gene analogues (RGA; Wisser et al., 2005). However, in our opinion, these analyses suffer from two limitations: 1) these publications use only a limited subset of the QTL data and/or candidate genes available, 2) some of these papers considered that all QTLs detected governed partial resistance. However, as previously shown for blast

For Peer Review

(Sallaud et al., 2003), QTL mapping can be used to efficiently detect complete resistance. Thus, using a QTL mapping strategy does not guarantee the identification of partial resistance.

To address these problems, we first attempted to compile an exhaustive list of QTLs, and then focused our analyses on partial resistance. In particular, we addressed the following two important questions: 1) Is partial resistance general (non specific)? 2) Is partial resistance caused by defeated complete resistance genes?

The objectives of this review are to:

1) Extensively review the information available on blast resistance genes and QTLs.

2) Provide accurate QTL data by a meta-analysis, and analyze the colocalization of the blast gene and QTL with candidate genes, using the rice genome sequence.

3) Formulate hypotheses regarding the molecular function of some partial resistance QTLs.

4) Draw conclusions for breeding of durably resistant rice cultivars.

A review of rice blast resistance genes and QTLs

A large amount of information is available on rice blast resistance. With a view to comparing partial and complete resistance, we first assembled this information by conducting a systematic survey of the literature.

Complete rice blast resistance genes

Rice blast disease resistance genes were first described by Sasaki in 1923. An important contribution was then made by Kiyosawa (1984). In 1995, the Rice Genetic Newsletter (RGN) published a report including a list of 26 blast resistance genes and since then has published the registration of 15 additional genes. Resistance genes are described in databases such as Gramene (http://www.gramene.org/) and Oryzabase (http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp). Genetic maps of rice blast resistance

For Peer Review

genes have been proposed in recent papers (Sallaud et al., 2003; Monosi et al., 2004). However, with the increasing number of newly mapped blast resistance genes, data from all these sources turned out to be incomplete. Starting from the data available in the RGN publication of 1995 and in the Gramene and Oryzabase databases, we updated this list of genes by searching the literature for publications on blast resistance genes. Unpublished data were also kindly provided by colleagues (referenced in Supplemental Table 1).

Despite the fact that they were identified after 1994, 18 genes were named without following the nomenclature of the Committee on Gene Symbolization (Kinoshita et al., 1994). More problematic, in some cases the same gene name was given to different genes, and nine redundant gene symbols are used (see Supplemental Table 2). It is thus necessary to clarify the identity of these different genes and, possibly, to rename some of them. In the future, the rice blast research community should try to apply the existing nomenclature rules.

We identified a total of 73 complete resistance genes (Supplemental Table 1), i.e. twice the number reported in recent publications (Sallaud et al., 2003; Monosi et al., 2004). As illustrated in Figure 1, we have physically mapped these genes on the genome of Nipponbare, using the position of the flanking markers given in the Gramene database. When the position of a marker was not available, the next flanking marker was used. The physical position of the resistance genes and their references are available from the OryGenesDB database (http://orygenesdb.cines.fr/cgi-bin/gbrowse/orygenesdb/).

As observed previously (Monosi et al., 2004), most of the resistance genes are concentrated in certain genomic regions, particularly on chromosomes 6, 11, and 12. More than 80% of the genes described colocalize on the genome (i.e. are anchored in overlapping intervals) with another mapped resistance gene (Figure 1). However, this apparent colocalization could be the result of several unrelated processes: the description of the same gene in different studies; the description of alleles of the same gene in different varieties; the real clustering of resistance

For Peer Review

genes; or poor mapping resolution, which can generate colocalization by chance. Fifteen of these genes are finely mapped (to less than 500 kb) (Table 2) and the cloning of most of them is in progress. For the others, a more precise description is needed.

As expected, in Nipponbare, 80% of these complete resistance genes colocalize with nucleotide binding site-leucine rich repeat (NBS-LRR) candidates, the most frequent type of RGA in rice. Eight complete resistance genes to blast have been cloned so far: *Pib* (Wang et al., 1999), *Pita* (Bryan et al., 2000), *Pikh* (Sharma et al., 2005), *Pi9* (Qu et al., 2006), *Pi2*/*Piz*t (Zhou et al., 2006), *Pid2* (Chen et al., 2006), *Pi36* (Liu et al., 2007), and *Pi37* (Lin et al., 2007) (Table 3). Apart from *Pid2*, which encodes a serine/threonine-kinase membrane-spanning protein, all these genes belong to the NBS-LRR resistance gene family.

Partial rice blast resistance genes.

Apart from 11 examples of partial resistance that segregated as monogenic traits (Table 4), most of the partial rice blast resistance genes were described in QTL mapping studies. We created a database containing all available information on rice blast resistance QTLs. We searched the literature for publications on QTLs for resistance to *M. oryzae*. Eighteen studies were analyzed, including two studies published for the first time in this paper (Table 1). All the identified QTLs were anchored to the rice genome, as described above for resistance genes. The physical position of the resistance genes and QTLs and their references are available from the OryGenesDB database (http://orygenesdb.cines.fr/cgi-bin/gbrowse/orygenesdb/).

Altogether, we counted 347 QTLs over the 12 chromosomes, i.e., on average, 28 QTLs were reported per chromosome. Each QTL has a mean physical length of 4.9 Mbp. These QTLs are inherited from 28 different parents used in crosses, mostly between one indica and one japonica parent. The position of these QTLs is available in Supplemental Table S3.

For Peer Review

Because the information generated by different studies was likely to be redundant, but also because further analysis could not be done on such a large number of QTLs, and in order to refine their positions, we decided to summarize the information by conducting a meta-analysis. Having QTLs from different populations and using different traits to measure resistance, a meta-analysis allows statistical estimation of whether some QTLs in fact correspond to one single QTL, and provides an estimation of the position of this MetaQTL (Goffinet and Gerber, 2000). This technique has been successfully applied, for example, to dissection of the genetic basis of flowering time in maize (Chardon et al., 2004), fibre development in cotton (Rong et al., 2007) and earliness in bread wheat (Hanocq et al., 2007).

The meta-analysis allowed detection of 165 MetaQTLs, thus reducing significantly the initial dataset of 347 QTLs. These data are available in supplemental Table S4 and on the OryGenesDB database (http://orygenesdb.cines.fr/cgi-bin/gbrowse/orygenesdb/) by activating the “All Rice MetaQTL” annotation layer in the genome browser. A graphical overview of the position of these MetaQTLs is presented in Figure 1. The average size of a MetaQTL is 3.3 Mbp, and, on average, there are 13 MetaQTLs per chromosome. Eleven percent of the MetaQTLs are finely mapped (< 500 kb) and 5% are large (>12 Mbp). On average, a MetaQTL is the consensus of 1.9 initial QTLs - only 10% come from four QTLs or more.

We then addressed the problem of identifying partial resistance among QTLs. As pointed out by Sallaud et al. (2003), QTL mapping can be used to efficiently detect complete resistance to blast. In fact, most QTL studies reveal loci for partial resistance and loci for complete resistance. We assumed that if one of the parents was completely resistant to the strain used then at least one complete resistance gene will segregate in the mapping population. In such cases, for the identification of partial resistance QTLs, completely resistant descendants should be excluded from the analysis or a detailed phenotype of the resistance of QTLs should be available (as in the case of *pi21*; Fukuoka et al., 2001). Because this information is rarely provided in the literature, we

For Peer Review

decided to consider the QTLs detected in such studies as a mixture of partial and complete resistance (Table 1). Similarly, field studies without control of strains are likely to detect both partial and complete resistance QTLs. These studies rely on natural inocula, which are mixtures of races of differing virulence spectrum. Such mixtures can mimic partial resistance. Therefore, in our analysis, we decided to separate QTLs obtained in the field from QTLs obtained in the greenhouse where the rice blast strains used for inoculation were controlled. This approach allowed us to identify a total of 49 MetaQTLs (Supplemental Table 4) as partial resistance MetaQTLs. For the other MetaQTLs, the nature (partial or complete) was considered undetermined, either because of insufficient information or because they are likely to mix both types of resistance.

Is partial resistance different from complete resistance?

To date, all described rice genes for complete resistance to blast are specific. On the contrary, partial resistance is thought to be general. Nevertheless, some publications provide examples of specific partial resistance (Yunoki et al., 1970; Bonman et al., 1989; Roumen, 1992; Fuji et al., 1995; Fukuoka and Okuno, 1997; Zenbayashi et al., 2002; Talukder et al., 2004; Lopez-Gerena, 2006). The only gene for partial resistance to blast cloned so far does not encode a classical NBS-LRR (see above). Thus, the functions of genes controlling partial resistance remain unknown. The 49 QTLs for partial resistance to blast assembled here provide an opportunity to test, on a relatively large sample, the specificity of these QTLs and genes, as well as colocalization with candidate genes.

Is partial resistance specific or general?

Direct comparison of the resistance spectrum of partial resistance MetaQTLs with that of complete resistance genes is difficult to realize because resistance spectrum evaluation differs (in

For Peer Review

particular regarding numbers of blast strains and choice of strains) between the two types of data. Therefore, the resistance spectra of the 49 MetaQTLs of partial resistance and the 116 MetaQTLs of unknown resistance were compared. If partial resistance is general, then the resistance detected by partial resistance MetaQTLs should be effective against more races than that of the "other MetaQTLs". We developed an index, named BSR for broad-spectrum resistance (Supplemental Table 3). When several strains were tested, no partial resistance MetaQTL was effective against all strains. Only three partial resistance MetaQTLs and two "other MetaQTLs" are associated with broad-spectrum resistance (BSR ratio >50%). The distributions of the BSR scores of these two types of MetaQTLs are not significantly different based on a chi square test (p-value = 0.06). Thus, there is no significant difference between the resistance spectrum of MetaQTLs selected as being associated with partial resistance and other MetaQTLs.

Which genes control partial resistance?

It has been proposed that partial and complete resistance could be governed by different types of genes. Several complete resistance genes to blast have been cloned: most of them (7/8) are members of the NBS-LRR family (see above). Genes controlling partial resistance to blast remain poorly documented. The only quantitative resistance gene cloned, *pi21*, is recessive (Fukuoka and Okuno, 2001) and is not a classical RGA (see above). It has also been proposed that specific partial resistance could be controlled by defeated complete resistance genes (Talukder et al., 2004). This mechanism was demonstrated for the rice complete resistance gene to bacterial blight *Xa4*. This gene shows residual resistance against virulent strains (Li et al., 1999). An alternative hypothesis could be that partial resistance is governed by defense genes. This hypothesis is supported by recent experiments showing the successful use of defense-gene-derived markers to improve selection for quantitative resistance to blast (Liu et al., 2004, Wu et al., 2004).

For Peer Review

If partial resistance is controlled either by defeated complete resistance genes or by defense genes, then MetaQTLs for partial resistance would be expected to co-localize with one these gene categories. The colocalization of QTLs of resistance to rice diseases and genes of the NBS-LRR family has already been attested (Wisser et al., 2005). However, this latter analysis did not differentiate between partial and complete resistance, putatively introducing a bias towards colocalization between QTLs and RGAs. Colocalization between QTLs and defense genes or defense regulators was also investigated (Wen et al., 2003; Wisser et al., 2005), but the number of genes tested was limited. We mapped RGAs in the genome of the japonica variety Nipponbare (see Table 5 for methods). We constructed an RGA map (available on the OryGenesDB database: Annotation layer "All RGA"). A map of *ca*. 4,100 defense genes compiled by Vergne et al. (this issue) is also available on the OryGenesDB database (http://orygenesdb.cines.fr/cgi-bin/gbrowse/orygenesdb/; Annotation layer "All rice defense genes").

We next compared the localization on the genome of the complete resistance genes mapped, the 49 selected MetaQTLs for partial resistance, and the other MetaQTLs with the localization of RGAs and defense genes (Table 5).

We first tested the colocalization between MetaQTLs and mapped resistance genes. These results show no significant differences between partial resistance MetaQTLs and other MetaQTLs (Table 5A). Despite a tendency of the MetaQTLs to colocalize with mapped resistance genes (61.2% and 57.8 % for partial resistance MetaQTLs and other MetaQTLs, respectively; Table 5B), this differs significantly from the proportion of mapped resistance genes that colocalize with other mapped resistance genes (83.9%). Colocalization between resistance genes is expected because resistance genes are clustered. Redundancy in the mapped resistance genes, some of which are probably identical or allelic, also contributes to colocalization.

We then tested possible colocalizations with RGA or defense genes. Most of the mapped resistance genes and MetaQTLs colocalized with an RGA or a defense gene (Table 5A). Based

For Peer Review

on the number of RGAs and the size of the genome, the distribution of RGAs can be estimated at ca. 9 RGAs per 3.3 Mbp (i.e. the average size of MetaQTLs we identified). Thus, any QTL or resistance gene mapped within an interval of 3.3 Mb will colocalize with RGAs purely by chance. To try to detect significant differences, we compared colocalization of MetaQTLs and genes with colocalization of a set of 2,000 random positions (with an average size similar to QTLs and genes) with candidate genes. As expected, the frequency of RGAs is significantly greater at the positions of mapped complete resistance genes than for the random set of genes (Table 5B). In contrast, the frequency of RGAs is not significantly greater at the positions of partial resistance MetaQTLs. These results show significant differences between partial resistance MetaQTLs and mapped complete resistance genes with regards to colocalization with RGAs. The frequency of defense genes does not seem to correlate with either the position of mapped resistance genes or the position of partial resistance MetaQTLs (Table 5B). These results do not support the hypotheses that partial resistance to blast is controlled by defeated resistance genes or by classical defense genes. In contrast, like mapped resistance genes, the "other MetaQTLs" colocalize with RGAs. This result supports the idea that “other MetaQTLs” are mainly correspond to complete resistance genes detected by a QTL method.

Conclusion

The lack of durably resistant varieties is due in part to pathogen evolution toward virulence. But it is also due to our limited knowledge of resistance mechanisms. In 1985, Ou stated: “The genetics of resistance are insufficiently known and are often oversimplified”. In the 20 years since then, the molecular function of some blast resistance genes has been described, and many QTLs for resistance to blast have been mapped. Moreover, relations between QTLs and ESTs (Wang et al., 2001), defense genes (Wen et al., 2003; Liu et al., 2004) and RGAs (Wisser et al., 2005) have

For Peer Review

been tested. But what do we really know of the genetics of resistance to blast? And is this knowledge appropriate and sufficient to improve breeding for durable resistance?

This review provides an updated overview of the mapped resistance genes and QTLs for resistance to rice blast. This information was used to try to clarify relationships between previously described resistance genes and QTLs. Extensive and curated analyses of published QTL data do not support the idea that partial resistance is more general than complete resistance. Our analyses confirm previous published results obtained on smaller scales (Bonman et al., 1989; Roumen, 1992; Talukder et al., 2004; Lopez-Gerena, 2006). The results suggest that differences in pathogenicity can be selected, and that partial resistance is likely to be overcome. Hence, partial resistance could turn out not to be durable. Our analyses do not support either of the following hypotheses: that partial resistance is controlled by defeated complete resistance genes or that it is controlled by classical defense genes. The first resistance gene for partial resistance to blast to be cloned, *pi21*, is neither an RGA nor a classical defense gene. Since it is not an RGA, it is surprising that *pi21* is specific. Defense mechanisms following recognition of the pathogen by the plant are likely to be triggered via different signaling pathways (Jones and Dangl, 2007). Some of these pathways might be specific to some complete resistance gene families. Thus, if *pi21* is one effecter or regulator of one such specific pathway, it will appear to be specific. Further characterization of *pi21* function will allow testing of this hypothesis. Moreover, further characterization of partial resistance is likely to reveal new functions in plant defenses. This will first require a finer mapping of QTLs for partial resistance.

No method of simplifying breeding for durable resistance emerges directly from this global analysis. If partial resistance is targeted (alone or in combination), the large number and wide distribution of QTLs controlling this trait are major constraints to the maintenance of favorable alleles for this character and to the incorporation of other favorable characters (yield, grain quality, abiotic stress tolerance, etc). However, the global analysis presented here allows us to identify a

For Peer Review

limited number (less than 10) of partial resistance QTLs with desirable characteristics: efficiency against most of the strains tested, identification in several independent experiments, and significant impact on resistance. These QTLs are, in our opinion, interesting targets for future breeding programs.

Acknowledgements

We are grateful to Prof. Qinghua Pan and Dr. Kazutoshi Okuno for providing us with unpublished results. E.B. was supported by grants from the French Ministry of Research and CIRAD. Part of this work was supported by a Genoplante grant (B8).

Literature cited

Abe, S. 2004. Breeding of a blast resistant multiline variety of rice, Sasanishiki BL. Jap. Agricul. Res. Quarterly. 38:149-154.

Ahn, S., Kim, N.Y.K., Hong, H.C., Han, S.S., Choi, H.C., Moon, H.P., and McCouch, S.R. 1997. Molecular mapping of genes for resistance to Korean isolates of rice blast, Harmonizing agricultural productivity and conservation of biodiversity. Breeding and ecology. 8th SABRAO Congress and Annual Meeting of Korean Breed. Soc. pp. 435-436.

Bagali, P.G., Hittalmani, S., Shashidhar, S.Y., and Shashidhar, H.E. 2000. Identification of DNA markers linked to partial resistance for blast disease in rice across locations. Advances in Rice Blast Research. D. Tharreau, M.H. Lebrun, N.J. Talbot, and J.L. Notteghem, Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 34-42.

Berruyer, R., Adreit, H., Milazzo, J., Gaillard, S., Berger, A., Dioh, W., Lebrun, M.H., and Tharreau, D. 2003. Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. Theor. Appl. Genet. 107:1139-1147.

For Peer Review

Bonman, J.M., Bandong, J.M., Lee, Y.H., and Lee, E.J. 1989. Race-specific partial resistance to blast in temperate japonica rice cultivars. Plant Disease, 73:496-499.

Bonman, J.M., Khush, G.S., and Nelson, R.J. 1992. Breeding rice for resistance to pests. Annu. Rev. Phytopathol. 30:507-528.

Bryan, G.T., Wu, K., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P., McAdams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R., and Valent, B. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. Plant Cell 12:2033-2045.

CAB. 1981. Distribution Maps of Plant Diseases Map 51, Edition 6.

Causse, M.A., Fulton, T.M., Cho, Y.G., Ahn, S.N., Chunwongse, J., Wu, K.S., Xiao, J.H., Yu, Z.H., Ronald, P.C., Harrington, S.E., Second, G., McCouch, S.R., and Tanksley, S.D. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. Genetics 138:1251-1274.

Chardon, F., Virlon, B., Moreau, L., Falque, M., Joets, J., Decousset, L., Murigneux, A., and 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.

Chen, H., Wang, S., Xing, Y., Xu, C., Hayes, P.M., and Zhang, Q. 2003. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 100:2544-2549.

Chen, S., Wang, L., Que, Z., Pan, R., and Pan, Q. 2005. Genetic and physical mapping of *Pi37*(t), a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St. No. 1. Theor. Appl. Genet. 111:1563-1570.

Chen, X., Shang, J., Chen, D., Lei, C., Zou, Y., Zhai, W., Liu, G., Xu, J., Ling, Z., Cao, G., Ma, B., Wang, Y., Zhao, X., Li, S., and Zhu, L. 2006. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice

For Peer Review

blast resistance. Plant J. 46:794-804.

Chen, X.W., Li, S.G., Xu, J.C., Zhai, W.X., Ling, Z.Z., Ma, B.T., Wang, Y.P., Wang, W.M., Cao, G., Ma, Y.Q., Shang, J.J., Zhao, X.F., Zhou, K.D., and Zhu, L.H. 2004. Identification of two blast resistance genes in a rice variety, Digu. J. Phytopath. 152:77-85.

Dardick , C., and Ronald, P. 2006. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. PLoS Pathog. 2(1):e2.

Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E., Birren, B.W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434:980-986.

Deng, Y., Zhu, X., Shen, Y., and He, Z. 2006. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm*(t) tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety. Theor. Appl. Genet.113:705-713.

Fujii, K., Hayano-Saito, Y., Shumiya, A., and Inoue, M. 1995. Genetical mapping based on the RFLP analysis for the panicle blast resistance derived from a rice parental line St.No.1. Breed. Sci. 45:209 (In Japanese).

Fukuoka, S., and Okuno, K. 1997. QTL analysis for Field resistance to rice blast using RFLP markers. Rice Genet. Newsl. 14:99.

Fukuoka, S., and Okuno, K. 2001. QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. Theor. Appl. Genet.103:185-190.

Fukuoka, S., Okuno, K., and Kawase, M. 2007. Rice blast disease gene *Pi21*, resistance gene *pi21* and utilization thereof. Patent WO/2007/000880

Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A.,

For Peer Review

Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J.P., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L. and Cooper, B, et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92-100.

Goffinet, B., and Gerber, S. 2000. Quantitative Trait Loci: A Meta-analysis. Genetics 155:463-473.

Goto, I. 1970. Genetic studies on the resistance of rice plant to the blast fungus. I. Inheritance of resistance in crosses Sensho X H-79 and Imochi-shirazu X H-79. Ann. Phytopath. Soc. Jap. 36:304-312.

Goto, I. 1988. Genetic studies on resistance of rice plant to blast fungus (VII). Blast resistance genes of Kuroka. Ann. Phytopath. Soc. Jap. 54:460-465. (In Japanese, English abstract).

Hanocq, E., Laperche, A., Jaminon, O., Laine, A.L., and Le Gouis, J. 2007. Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis. Theor Appl Genet. 114:569-584.

Huang, H.J., Tseng, C.S., and Lai, M.H. 2004. Identification and Mapping of the QTL Controlling Resistance to Blast (*Magnaporthe grisea*) Disease in Rice. J. Genet. Mol. Biol. 15:96-107 (In Chinese, English abstract)..

Jeon, J.S., Chen, D., Yi, G.H., Wang, G.L., and Ronald, P.C. 2003. Genetic and physical mapping of Pi5(t), a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. Mol. Genet. Geno. 269:280-289.

Johnson, R. 1981. Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. Phytopathology 71:567-568.

Jones, J.D., and Dangl, J.L. 2006 The plant immune system. Nature 444:323-329.

Khush, G.S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. Plant Mol. Biol. 59:1-6.

Kinoshita, T., Inukai, T., and Toriyama, K. 1994. Reports from coordinators; Gene symbols for

For Peer Review

blast resistance newly revised. Rice Genet. Newslet. 11:16-17.

Kiyosawa, S. 1970. Inheritance of a particular sensitivity of the variety Sekiguchi Asahi to pathogens and chemicals and linkage relationship with blast resistance genes. Bull. Nat. Inst. Agricult. Sci. 21:61-71.

Kiyosawa, S., and Ling, Z.Z. 1984. Identification of genes for rice blast resistance in Chinese differential varieties with Japanese fungus strains. Scientia Sinica 27:273-283.

Lei, C.L., Huang, D.Y., Li, W., Wang, J.L., Liu, Z.L., Wang, X.T., Shi, K., Cheng, Z.J., Zhang, X., Ling, Z.Z., and Wan, J.M. 2005. Molecular mapping of a blast resistance gene in an indica rice cultivar Yanxian No. 1. Rice Genet. Newslet. 22:76-77.

Li, Z.K., Luo, L.J., Mei, H.W., Paterson, A.H., Zhao, X.H., Zhong, D.B., Wang, Y.P., Yu, X.Q., Zhu, L., Tabien, R., Stansel, J.W., and Ying, C.S. 1999. A "defeated" rice resistance gene acts as a QTL against a virulent strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol. Gen. Genet. 261:58-63.

Lin, F., Liu, Y., Wang, L., Liu, X., and Pan, Q. 2007. A high-resolution map of the rice blast resistance gene *Pi15* constructed by sequence-ready markers. Plant Breeding 126 :287-290.

Liu, B., Zhang, S., Zhu, X., Yang, Q., Wu, S., Mei, M., Mauleon, R., Leach, J., Mew, T., and Leung, H. 2004. Candidate defence genes as predictors of quantitative blast resistance in rice. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:1146-1152.

Liu, X., Lin, F., Wang, L., and Pan, Q. 2007. The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice CC-NBS-LRR gene which confers race-specific resistance to the blast fungus. Genetics 176:2541-2549.

Loan, L.C., Du, P.V.., and Li Z.K.. 2003. Identification of genes conferring resistance to some Philippine and Vietnamese races of blast. Omonrice 11: 49-62.

For Peer Review

Lopez-Gerena, J. 2006. Mapping QTL controlling durable resistance torice blast in the cultivar Oryzica Llanos 5. PhD Thesis, Universidad del Valle, Plant Pathology College of Agriculture, Cali, Colombia and Kansas State University, USA. 142 pp.

Miyamoto, M., and Hirasawa, H. 2003. Relationship between RFLP loci with different alleles on chromosome 4 and the levels of blast field resistance in Japanese upland rice varieties. Breed. Sci. 53:1-5.

Miyamoto, M., Yano, M., and Hirasawa, H. 2001. Mapping of quantitative trait loci conferring blast field resistance in the Japanese upland rice variety Kahei. Breed. Sci. 51:257-261.

Monosi, B., Wisser, R.J., Pennill, L., and Hulbert, S.H. 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. Theor. Appl. Genet. 109:1434-1447.

Nguyen, T.T.T., Koizumi, S., La, T.N., Zenbayashi, K.S., Ashizawa, T., Yasuda, N., Imazaki, I., and Miyasaka, A. 2006. *Pi35*(t), a new gene conferring partial resistance to leaf blast in the rice cultivar Hokkai 188. Theor. Appl. Genet. 113:697-704.

Okuno, K., and Fukuoka, S.. 2002. An Enhancement Strategy for Rice Germplasm: DNA Marker-assisted Identification of Beneficial QTL for Resistance to Rice Blast. Managing Plant Genetic Diversity. J.M.M. Engels, V. Ramanatha Rao, A.H.D. Brown, and M.T. Jackson, Eds. IPGRI.

Ou, S.H. 1985. Blast, Rice Diseases. 2nd edition. Commonwealth Agricultural Bureaux., Slough, UK, pp. 109-201.

Pan, Q.-H., Hu, Z.-D., Takatoshi, T., and Wang, L. 2003. Fine Mapping of the Blast Resistance Gene *Pi15*, Linked to *Pii*, on Rice Chromosome 9. Acta Botanica Sinica 45:871-877.

Qu, S., Liu, G., Zhou, B., Bellizzi, M., Zeng, L., Dai, L., Han, B., and Wang, G.-L. 2006. The Broad-Spectrum Blast Resistance Gene *Pi9* Encodes a Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Protein and Is a Member of a Multigene Family in Rice. Genetics 172:1901-1914.

For Peer Review

Ramalingam, J., Vera Cruz, C.M., 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., and Leung H. 2003. Candidate defence genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. Mol. Plant Microbe Interact. 16:14-24.

Ribot, C., Hirsch, J., Balzergue, S., Tharreau, D., Nottéghem, J.L., Lebrun, M.H., and Morel, J.B. 2007. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Journal of Plant Physiology. In press. doi:10.1016/j.jplph.2007.06.013

Rong, J., Feltus, F.A., Waghmare, V.N., Pierce, G.J., Chee, P.W., Draye, X., Saranga, Y., Wright, R.J., Wilkins, T.A., May, O.L., Smith, C.W., Gannaway, J.R., Wendel, J.F., and Paterson, A.H. 2007. Meta-analysis of polyploid cotton QTL shows unequal contributions of subgenomes to a complex network of genes and gene clusters implicated in lint fiber development. Genetics 176:2577-2588.

Roumen, E.C. 1992. Small differential interactions for partial resistance in rice cultivars to virulent isolates of the blast pathogen. Euphytica 64:143-148.

Sallaud, C., Lorieux, M., Roumen, E., Tharreau, D., Berruyer, R., Svestasrani, P., Garsmeur, O., Ghesquiere, A., and Notteghem, J.L. 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. Theor. Appl. Genet. 106:794-803.

Sasaki, R. 1923. Existence of strains in rice blast fungus II. Journal of Plant Protection 10:1-10. (In Japanese).

Sato, H., Takeuchi, Y., Hirabayashi, H., Nemoto, H., Hirayama, M., Kato, H., Imbe, T., and Ando, I. 2006. Mapping QTLs for field resistance to rice blast in the Japanese upland rice variety Norin 12. Breed. Sci. 56:415-418.

Sharma, T.R., Shanker, P., Singh, B.K., Jana, T.K., Madhav, M.S., Gaikwad, K., Singh, N.K., Plaha, P., and Rathour, R. 2005. Molecular mapping of rice blast resistance gene *Pi-kh* in

For Peer Review

the rice variety Tetep. J. Plant Biochem. Biotec. 14:127-133.

Shen, M.G., and Lin, J.Y. 1994. The economic impact of rice blast disease in China, Rice Blast Disease. R.S. Zeigler, S.A. Leong, and P.S. Teng, Eds. CAB International/IRRI, Wallingford, UK, pp. 321-331.

Shinoda, H., Toriyama, K., Yunoki, T., Ezuka, A., and Sakurai, Y. 1971. Studies on the varietal resistance of rice to blast. 6. Linkage relationship of blast resistance genes. Bull. Chugoku Natl. Agric.. Exp. Sta. A20:21-25. (In Japanese)

Sirithunya, P., Tragoonrung, S., Vanavichit, A., Pa-In, N., Vongsaprom, C., and Toojinda, T. 2002. Quantitative Trait Loci Associated with Leaf and Neck Blast Resistance in Recombinant Inbred Line Population of Rice (*Oryza sativa*). DNA Research 9:79-88.

Tabien, R.E., Li, Z., Paterson, A.H., Marchetti, M.A., Stansel, J.W., and Pinson, S.R.M. 2002. Mapping QTLs for field resistance to the rice blast pathogen and evaluating their individual and combined utility in improved varieties. Theor. Appl. Genet. 105:313-324.

Takahashi, Y. 1965. Genetics of resistance to the rice blast disease. The Rice Blast Disease. The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, pp. 303-329.

Talukder, Z.I., McDonald, A.J.S., and Price, A.H. 2005. Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL x environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. New Phytologist 168:455-464.

Talukder, Z.I., Tharreau, D., and Price, A.H. 2004. Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. New Phytologist 162:197-209.

Valent, B. 1990. Rice blast as a model system for plant pathology. Phytopathology 80:33-36.

Veneault-Fourrey, C., and Talbot, N.J. 2005. Moving toward a systems biology approach to the study of fungal pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Advanced Appl. Microbiol. 57:177-215.

For Peer Review

Wang, G.L., Mackill, D.J., Bonman, J.M., McCouch, S.R., Champoux, M.C., and Nelson, R.J. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421-1434.

Wang, Z., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Sasaki, T., and Yano, M. 2001. Expression of the *Pib* rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favouring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defences. Plant Mol. Biol. 47:653-661.

Wang, Z., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H., Katayose, Y., and Sasaki, T. 1999. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Plant Journal 19:55-64.

Wen, N., Chu, Z., and Wang, S. 2003. Three types of defence-responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. Mol. Genet. Geno. 269:331-339.

Wisser, R.J., Sun, Q., Hulbert, S.H., Kresovich, S., and Nelson, R.J. 2005. Identification and Characterization of Regions of the Rice Genome Associated With Broad-Spectrum, Quantitative Disease Resistance. Genetics 169:2277-2293.

Wu, J.L., Fan, Y.Y., Li, D.B., Zheng, K.L., Leung, H., and Zhuang, J.Y. 2005. Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei 2 against multiple isolates. Theor. Appl. Genet. 111:50-56.

Wu, J.L., Sinha, P.K., Variar, M., Zheng, K.L., Leach, J.E., Courtois, B., and Leung, H. 2004. Association between molecular markers and blast resistance in an advanced backcross population of rice. Theor. Appl. Genet. 108:1024-32.

Xu, J., Wang, J., Ling, Z. and Zhu, L. 2004. Analysis of rice blast resistance genes by QTL mapping. Chinese Sci. Bull. 49:337-342.

Yamaguchi, I. 2004. Overview on the chemical control of rice blast disease, Rice blast:interaction

For Peer Review

with rice and control. S. Kawasaki, Ed. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-13.

Yunoki, T., Ezuka, A., Sakurai, Y., Shinoda, H., and Toriyama, K. 1970. Studies on the varietal resistance to rice blast. 3. Testing methods for field resistance on young seedling grown in greenhouse. Bull. Chugoku Natl. Agr. Exp. Sta. E6:1-19.

Zeigler, R.S., Tohme, J., Nelson, R., Levy, M., and Correa-Victoria, F.J. 1994. Lineage exclusion a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. Rice Blast Disease. CAB International/IRRI, Wallingford, UK, pp. 267-292.

Zenbayashi, K., Ashizawa, T., Tani, T., and Koizumi, S. 2002. Mapping of the QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32. Theor. Appl.Genet. 104:547-552.

Zenbayashi-Sawata, K., Ashizawa, T., and Koizumi, S. 2005. *Pi34-AVRPi34*:a new gene-for-gene interaction for partial resistance in rice to blast caused by *Magnaporthe grisea*. J. Gen.Plant Pathol. 71:395-401.

Zhou, B., Qu, S.H., Liu, G.F., Dolan, M., Sakai, H., Lu, G.D., Bellizzi, M., and Wang, G. 2006. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. Mol. Plant-Microbe Interac. 19:1216-1228.

Zhu, Y., Chen, H., Fan, J., Wang, Y., Li, Y., Chen, J., Fan, J., Yang, S., Hu, L., Loung, H., Mow, T.W., Teng, P.S., Wang, Z., and Mundt, C.C. 2000. Genetic diversity and disease control in rice. Nature 406:718-722.

For Peer Review

Table 1: Literature sources used in the meta-analysis of QTLs for resistance to rice blast

References	Population	Environment	Complete resistance mapping allowed	Descendants used	Partial Resistance
Sirithunya et al., 2002	CT9993-5-10-1-m × KDML105	Greenhouse and Field	Yes	All	Nd
Bagali et al., 2000	IR64 x Azucena	Greenhouse and Field	Yes	All	No
Fukuoka and Okuno, 2001; Okuno and Fukuoka, 2002	Nipponbare x Owarihatamochi	Field	Yes	All	No
Miyamoto, et al. 2001; Miyamoto et al., 2003	Kahei x Koshihikari	Field	Yes	All	No
Sallaud et al., 2003	IR64 x Azucena	Greenhouse	Yes	All	No
Chen et al., 2003	Zhenshan 97 x Minghui 63	Greenhouse	Yes	All	No
Huang et al., 2004	Tainung 69 x Koshihikari	Greenhouse and Field	Yes	All	No
Xu et al., 2004	ZYQ8 x JX17	Greenhouse	Yes	All	No
Sato et al., 2006	URN12 x Koshihikari	Field	No	All	No
Wang et al., 1994	Moroberekan x Co39	Greenhouse and Field	Yes	Resistant and Susceptible separately	Yes
Tabien et al., 2002	Lemont x Teqing	Greenhouse and Field	Yes	All	No
Zenbayashi et al., 2002.	Norin29 x Chubu32	Field	No	Susceptible	Yes
Loan et al., 2003	Lemont x Teqing	Greenhouse	Yes	Resistant and Susceptible separately	Yes
Talukder et al., 2004 and 2005.	Bala x Azucena	Greenhouse	No	All	Yes
Wu et al., 2005	Zhong 156 x Gumei 2	Greenhouse and Field	Yes	Resistant and Susceptible separately	Yes
Lopez-Gerena, 2006	Oryzica Llanos 5 x Fanny	Greenhouse	Yes	All	Yes
A. Price, unpublished	Bala x Azucena	Greenhouse	Yes	All	Yes
D. Tharreau and J.B. Morel, unpublished	IR64 x Azucena	Greenhouse	No	All	Yes

For Peer Review

Table 2: Finely mapped resistance genes (<500 kb)

Gene symbol	Chromosome	Size (kbp)	Synonyms	Genotype	Candidate genes in Nipponbare	Reference
IPi	12	292.1	*Rmg56, IPi(t)**	nd	1 RPM1-like	Causse et al., 1994
IPi3	12	292.1	*Rmg57, IPi3(t)**	nd	1 RPM1-like	Causse et al., 1994
Pb1	11	349.7	*RMg58, Pbst*	Modan		Fujii et al., 1995
Pi15	9	44.6	*Pi15(t), Pi14, RMg34*	GA25	2 RPM1-like	Pan et al., 2003; Lin et
Pi24	1	313.7	*RMg61*	Azucena	1 non RD kinase	Sallaud et al., 2003
Pi25(t)	2	263.3	*RMg62*	IR64		Sallaud et al., 2003
Pi33	8	237.0	*Pi33(t), RMg70*	IR64	3 RPM1-like	Berruyer et al., 2003
Pi34	11	67.0	*RMg71*	Chubu 32	5 RPM1-like and 1 Xa21-like	Zenbayashi et al., 2002
Pi39	12	37.7		Q15	1 RPM1-like and 1 Pto-like	Liu et al., 2007
Pi42	9	105.6		nd	2 RPM1-like	Pan, unpublished
Pi5	9	168.6	*RMg22, Pi5(t), Pi3, RMg21*	C104PKT	3 RPM1-like	Wang et al., 1994; J 2003
Pigm(t)	6	53.8		Gumei4	4 RPM1-like	Deng et al., 2006
Pik	11	218.0	*RMg8, Pik-s, Pik-p, Pik-m (Pi m), Pik-h, Pi k-g*	K60	5 RPM1-like	Kiyosawa, 1970
Pi-x(t)	2	336.0		nd	1 RPG1-like	Huang, unpublished
Pi-y1(t)	2	110.4		Yanxian 1		Lei et al., 2005
Pi-y2(t)	2	110.4		Yanxian 1		Lei et al., 2005

For Peer Review

Table 3: Summary of information on cloned resistance genes

Gene symbol	Chromosome	Accession	Avr cloned	Direct interaction	RGA Type	References
Pib	2	AB013448	No	ND	NBS-LRR	Wang et al., 1999
Pita	12	AF207842	Metalloprotease	Yes	NBS-LRR	Bryan et al., 2000
Pikh	11	AY914077	No	ND	NBS-LRR	Sharma et al., 2005
Pi9	6	ABB88855	No	ND	NBS-LRR	Qu et al., 2006
Pi2/*Piz*t	6	ABC94599/DQ352040	No	ND	NBS-LRR	Zhou et al., 2006
Pid2	6		No	ND	B lectin receptor Ser/Thr kinase	Chen et al., 2006
Pi36	8	DQ900896	No	ND	NBS-LRR	Liu et al., 2007
Pi37	1	DQ923494	No	ND	NBS-LRR	Lin et al., 2007

Gene symbol	Length	Localization	Expression	Locus structure	Alleles	Origin
Pib	1,251 aa	ND	circadian, inducible by stress	2 genes	3 susceptible mutants	indica
Pita	928 aa	Cytoplasm	Constitutive	2 genes	1 aa with susceptible indica, 5 aa with susceptible japonica	indica
Pikh	330 aa	ND	inducible, difference Resistant/Susceptible	6 genes	1 substitution in the promotor	indica
Pi9	1,032 aa	ND	Constitutive	9 genes		*Oryza minuta*
Pi2/*Piz*t	1,032-1,033 aa	ND	Constitutive	9 genes	8 aa between *Pi2* and *Piz*t	indica
Pid2	825 aa	Membrane	Constitutive	Simple	1 aa in TM with susceptible	indica
Pi36	1,056 aa	ND	Constitutive	Simple	1 aa	indica
Pi37	1,290 aa	Cytoplasm	Constitutive	4 genes	6 aa with susceptible	japonica

Table 4: Monogenic resistance genes mapped for partial resistance.

Gene symbol	Synonyms	Chromosome	Gramene Accession	Genotype	Reference
Pb1	*RMg58, Pbst*	11	GR:0060596	Modan	Fujii et al., 1995
pi21	*rMg40*	4	GR:0060650	Owarihatamochi	Fukuoka and Okuno, 1997
Pi21	*RMg41*	12	GR:0060651	Suweon 365	Ahn et al., 1997
Pi22	*RMg42,*	6	GR:0060652	Suweon 365	Ahn et al., 1997
Pi23	*RMg43*	5	GR:0060653	Suweon 365	Ahn et al., 1997
Pi34	*RMg71*	11	GR:0061457	Chubu 32	Zenbayashi et al., 2002
Pi35(t)		1		Hokkai 188	Nguyen et al., 2006
Pif	*RMg3*	11	GR:0060614	St No.1	Yunoki et al., 1970
Pikur1	*RMg9*	4	GR:0060620	Kuroka	Shinoda et al., 1971
Pikur2	*RMg10,*	11	GR:0060621	Kuroka	Goto, 1988
Pise1	*RMg11, Rb1*	11	GR:0060622	Sensho	Goto, 1970

For Peer Review

Table 5: Colocalization of resistance genes, MetaQTLs and candidate genes.

To test the colocalization of resistance genes or MetaQTLs with RGAs, we considered six RGA types: NBS-LRR (e.g. RPM1), LRR-kinase XII (e.g. Xa21), LRR-kinase LRK10L-2 (e.g. RLK10), Waka kinase (e.g. RPG1), Sd2b kinase (e.g. Pid2) and CrRLK1L-1 RD-kinase (e.g. Pto). These different families were established thanks to additional data on non-RD kinase (Dardick and Ronald, 2006) and using the tools domain search in the OryGenesDB (http://orygenesdb.cirad.fr/index.htm) for the Pfam domain NB-ARC. We also mapped other non-RD and RD kinases for which no proof of implication in resistance exists at present.

To test the colocalization of resistance genes or MetaQTLs with defense genes, we used the map of 4,100 defense genes compiled by Vergne et al. (this issue), which is available on the OryGenesDB database.

A Frequency of mapped resistance genes or MetaQTLs that colocalize with at least one other mapped resistance gene or with one or morecandidate gene.

B Frequency of candidate genes located in a position where Mapped blast R genes, partial resistance MetaQTLs, Other Meta QTLs, specific MetaQTLs or Broad spectrum MetaQLs were mapped. A random set of 2,000 cDNAs was generated and their colocalization with resistance genes and MetaQTLs was tested. Frequencies of colocalizations with these random cDNA were compared to frequencies of colocalization with RGAs and defense genes using a Chi^2 test. p-values are indicated as follows < 0.001 ***, 0.001<p<0.01 **, 0.01<p<0.05 *.

A

	Mean Length	Number	Mapped blast R genes	RGA	Defense gene
Mapped blast R genes	4.42 Mbp	88	83.91%	86.21%	88.51%
Partial Resistance MetaQTLs	4.48 Mbp	48	61.22%	83.67%	97.96%
Other MetaQTLs	2.85 Mbp	117	57.76%	78.45%	98.28%

B

	Number	Mapped blast R genes	Partial resistance MetaQTLs	Other MetaQTL	specific MetaQTLs	Broad spectrum MetaQTLs
RGA	959	**59.4%*** **	42.20%	**61.2%*** **	37.50%	9.49%
Defense gene	4100	36.22%	45.20%	52.59%	nd	nd
Random cDNA	2000	38.43%	43.69%	53.48%	34.67%	10.92%

Supplemental Table 1: A list of rice blast resistance genes

We searched the literature for publications on resistance genes to *M. oryzae.* All the genes thus identified were anchored to the rice genome using the position of the flanking markers in the Gramene database. When the position of a marker was not available, the next flanking marker was used.

For Peer Review

Gene symbol	Synonyms	Gramene Accession	Genotype	Chr	Marker mapped	Position (bp)	Reference
Pit	RMg15	GR:0060626	K 59, BL10, Tjina	1	t311-t8042	2270216-3043185	Kiyosawa, 1972
Pitp(t)*	Rmg72	GR:0061458	Tetep	1	RM34-RM443	25135400-28667306	Barman et al, 2004
Pi35(t)			Hokkai 188	1	RM1216-RM1003	32435126-33803800	Nguyen et al., 2006
Pi37(t)			St N°1	1	RM543-FPSM1	33110281-33489931	Chen et al., 2005
Pi41			Nipponbare	1	RM543-RM319	33110281-34005652	Lin et al., unpublished
Pish	RMg14	GR:0060625	Shin 2, Nipponbare, Pi No.4, Fukunishiki, Norin 22, Kusabue, BL1	1	RM212-RM486	33381385-35283446	Imbe and Matsumoto, 1985
pi25(t)			Sanbangqishiluo	1	RM226-RM5448	34360810-37725160	Yang, 2001, Bin Liang, 2002
Pi24	RMg61	AQCT001	Azucena	1	RM522-RM151	5242654-5556378	Sallaud et al., 2003
Pi27			Q14	1	RM151-RM259	5556378-7443429	Zhu et al., 2004
Pi14	RMg33, Pi14(t)	GR:0060643	Maowangu	2	0-RZ476	1-6725831	Pan et al., 1996
Pi16	RMg35, Pi16(t)	GR:0060645	Aus373	2	0-RZ476	1-6725831	Pan et al., 1997
Pi-d(t)1			Digu	2	S2068-G45	20143072-22595831	Chen et al., 2004
Pi-g(t)			Guangchangzhan	2	RM166-RM208	34346727-35135783	Zhou et al., 2004
Pitq5	Pitq5*, RMg54	GR:0060664	teqing	2	RZ446-RG520	34614264-35662091	Tabien et al., 2000
Pi-x(t)				2	RM3535-RM3248	34689397-35025372	Huang, not published
Pi-y1(t)			Yanxian 1	2	RM3248-RM208	35025372-35135783	Lei et al., 2005
Pi-y2(t)			Yanxian 1	2	RM3248-RM208	35025372-35135783	Lei et al., 2005
Pib	Pis, RMg2, Pi-hy	GR:0060613	BL1-1, Tjina	2	Os02g57310	35107768-35112900	Wang et al, 1999
Pi25(t)	RMg62	GR:0061348, AQCT002	IR64	2	RG520-end	35662091-35925388	Sallaud et al., 2003
Pitq2	Piq2*, RMg51, Pitq2*	GR:0060661	teqing	2			Tabien et al., 1996
Pitq3	Pitq3*, RMg52, Piq3*	GR:0060662	teqing	3			Tabien et al., 1996
pi21	rMg40	GR:0060650	Owarihatamochi	4	G271-E60696S	20157353-21802232	Fukuoka and Okuno, 1997
Pi-?(t)			IR64	4	RM518-RG190	2021675-8595185	sallaud et al, 2003
Pikur1	Pikur1*, RMg9	GR:0060620	Kuroka	4	E50720S-S12653S	24611955-33558479	Shinoda et al. 1971
Pi(t)	Pi(t)*, RMg19	GR:0060629	P167	4	RG190-RM185	8595185-18564328	Hsieh, 1976
Pitq4	RMg53, Pitq4*, Piq4*	GR:0060663	teqing	4			Tabien et al., 1996
Pi23	Pi23(t)*, RMg43	GR:0060653	Suweon 365	5	RM164-RM249	10755867-19175845	Ahn et al, 1997
Pi10	RMg27, Pi10(t)*	GR:0060637	Tongil	5	P37-RG13	14521809-18854305	Causse et al, 1994
Pi26(t)	Rmg63	GR:0061349	Azucena	5	RZ556-RG313	2069318-2760202	Sallaud et al, 2003
Piz	RMg17, Pi2	GR:0060628	Toride 1, Fukei 67, C101A51, Fukunishiki-1, 5173, Zenith	6	z4792-z5765	10155975-10517612	Zhou et al., 2006
Pigm(t)			Gumei4	6	C5483-C0428	10367751-10421545	Deng et al., 2006
Pi9	RMg26, Pi9(t)*	GR:0060636	WHD75-1-127, Oryza minuta	6	Os06g17900	10386510-10389466	Qu et al., 2006
Pi13	RMg32, Pi13*, Pi13(t)*	GR:0060642	Kasalath	6	R538-R1960	12456009-16303608	Hayasaka et al., 1995
Pi-d(t)2			Digu	6	Os06g29810	17159337-17163868	Chen et al., 2004
Pi25	Pi25(t), RMg60 , RMg62	GR:0061186	Gumei 2	6	R3902-R2140S	18080056-19257588	Zhuang, et al. 2001
Pi13(t)	RMg31, Pi13(t)	GR:0060641	Maowangu	6	RM587-RG648	2291804-19337620	Pan et al, 1996
Pii1	Pii, RMg4	GR:0060615	Ishikari Shiroke, Fujisaka5	6	RM587-RM400	2291804-28431560	Yamasaki and Kiyosawa, 1966
Pitq1	Pitq1*, Piq1*, RMg50	GR:0060660	teqing	6	RM340-RM412	28599181-30327854	Tabien et al., 1996
Pi22	RMg42, Pi22(t)*	GR:0060652	Suweon 365	6	RZ588-RG138	4897048-6023472	Ahn et al, 1997
Pi27(t)	Rmg64		IR64	6	RM276-RM549	6230045-6976491	Sallaud et al, 2003
Pi8	RMg25	GR:0060635	Kasalath	6	RM276-RM136	6230045-8751256	Pan et al, 1995
Pi26			Gumei2	6	RM136-R2123	8751256-11676579	Wu et al., 2005
Pi17	Pi17(t), RMg36	GR:0060646	DJ123	7	R1357-S13453	22250443-24995083	Pan et al., 1996
Pi36			Q61	8	Os08g05440	2870061-2884353	Liu et al., 2005
Pizh	Pi11(t)*, RMg28	GR:0060638	Zhai-Ye-Qing 8	8	RM25-RM284	4372113-21012219	Tanksley et al., 1993
Pi33	Pi33(t), RMg70		IR64, TYC, O. rufipogon, ZYQ8	8	Pi33-RM3507	5915858-6152906	Berruyer et al., 2003
Pi29(t)	RMq66, Pi29(t)*	GR:0061352	IR64	8	AF159886-RG1034	9664057-16241105	Sallaud et al., 2003
non nommé				8			Sharma et al., unpublished
Pi-GD-1			Shanhuangzhan	8			Liu et al., 2004
Pii2	Pii2*, RMg5	GR:0060616	Ishikari Shiroke	9	RM316-RZ698	1022662-7222779	Kinoshita and Kiyosawa, 1997
Pi42				9	RM107-RM201	20068688-20174289	Pan, not published
Pi5	RMg22, Pi5(t), Pi3, RMg21	GR:0060631/GR:00606 32	C104PKT	9	C1454-S04G03	9630818-9799398	Wang et al, 1994; Jeon et al., 2003
Pi15	Pi15(t), Pi14, RMg34	GR:0060644	GA25	9	CRG5-CRG2	9641358-9685993	Pan et al., 2003; Lin et al., 2007
Pi28(t)	Rmg65	GR:0061351	Azucena	10	RG134-C223	19565132-22667948	Sallaud et al, 2003
Pi-GD-2			Shanhuangzhan	10			Liu et al., 2004
Pi-lm2		AQAQ017	Lemont	11	L457b-RZ536X	13635033-28377565	Tabien et al., 2000.
Pbst*				11	G257-S723	17317267-21361768	Fujii et al. 1995
PBR*				11	E11749-E10310S	18593380-23669599	Fujii et al. 1995
Pi38			Tadukan	11	RM21-RM206	19137900-21979485	Gowda et al., 2006
Pi34	RMg71	GR:0061457	Chubu 32	11	E1126-C1172	19423000-19490000	Zenbayashi et al., 2002
Pi44	RMg44, Pi44(t)*	GR:0060654	RIL276, Moroberekan	11	C1172-RZ424	20549800-26004823	Chen et al., 1999
Pb1	RMg58, Pbst	GR:0060596	Modan	11	C189-S723	21711437-21361768	Fujii et al. 1995
Pif	RMg3	GR:0060614	St No.1, Chugoku 31-1	11	C53951S-end	24695583-28462103	Yunoki et al., 1970
Pikh		AAY33493	Tetep	11	Os11g42010	24761902-24762922	Sharma et al., 2005
Pi1	RMg20, Pi7(t), RMg24	GR:0060630	LAC23, C101LAC	11	RM1233-RM6094	26498854 -28374448	Mackill and Bonman, 1992
Pi18	Pi18(t), RMg37, Pi18(t)*	GR:0060647	Suweon 365	11	RM224-RZ536	26796917-28376959	Ahn et al, 1996
Pib2	RMg49, Pilm2, Magnaporthe grisea resistance from Lemont	GR:0060659	Lemont	11	RM224-RZ536	26796917-28376959	Tabien et al., 1996
Pik	RMg8, Pik-s, Pik-p, Pik-m (Pi m), Pik-h, Pi k-g	GR:0060619	K60, Chugoku 31, Shin 2-1, K2, K3, Fuji 120, Kanto 51, LAC23	11	k6441-k8823	27314916-27532928	Kiyosawa, 1970
Pikur2	RMg10, Pikur2*	GR:0060621	Kuroka	11	RM332-RM229	2840211-18372685	Goto, 1988
Piis1	Rb4, Rmg6	GR:0060617	Imochi-shirazu	11	RM332-RM457	2840211-19029573	Goto, 1970
MPiz	RMg18, Rb6	GR:0060533	zenith	11	RM167-RM287	4073024-16730739	Goto, 1976
Pia	RMg1	GR:0060612	Aichi Asachi	11	RM167-E30537S	4073024-8078510	Shinoda et al., 1971
Pi30(t)	RMg67, Pi30(t)*	GR:0061353	IR64	11	RG118-AF074889	441392-6578785	Sallaud et al, 2003
Pise1	RMg11, Rb1	GR:0060622	Sensho	11	RM116-RM287	5740642-16730739	Goto, 1970
Pi-Co39			Co39	11	RPR1-S2712	6304007-6888870	Chauhan et al., 2002
Pita2			Katy	12	RM155-RM7102	10078620-13211331	nakamura et al., 1997
Pita	Pita2, Pi4a, RMg16	GR:0060627	Pi No. 1, Pi No. 4, Yashiro-mochi, Tadukan-1, K1, Nakei 212	12	Os12g18360	10603772-10609330	Bryan et al., 2000
Pi39			Q15	12	39M11-39M22	10614346-10652094	Liu et al., 2007
Pi32(t)*	RMg69	GR:0061355; AQCT009	IR64	12	CSU70-G2140	13103039-18867450	Sallaud et al, 2003
Pi40			93-11	12	RM28112-RM1261	16274830-17531111	Yang et al., unpublished
Pi62	RMg45,Pi62(t)*, =Pita ?	GR:0060655	Yashiro-mochi	12	RZ816-RG9	2426648-18050026	Wu et al., 1996
Pi6	RMg23, Pi6(t)*	GR:0060633	Apura	12	R367-G2140	4053339-18867450	Tanksley et al., 1993
Pitq6	RMg55, Pitq6*	GR:0060665	teqing	12	RZ397-RG869	5758663-7731471	Tabien et al., 2000
Pi24	Pi24(t), RMg59		Zhong 156	12	RG81-RG241	5832357-7438930	Zhuang, et al. 2001
Pi20	Pi20, RMg39	GR:0060649	IR24	12	E30009S-C53024S	6988220-10603823	Imbe et al. 1997
Pi12	RMg30, Pi12*, Pi12(t)*	GR:0060640	K80R, Hong-jiao-zhan	12	E30009S-S13126S	6988220-15120464	Zheng et al, 1996
Pi12	Pi12(t), RMg29	GR:0060639	Moroberekan	12	E30009S-S13126S	6988220-15120464	Inukai et al, 1996
Pi21	Pi21(t)*, RMg41	GR:0060651	Suweon 365	12	E30009S-C61722S	6988220-16395622	Ahn et al, 1997
IPi	Rmg56, IPi(t)*	GR:0060472		12	RG241X-RG869	7438930-7731060	Causse et al, 1994
IPi3	Rmg57, IPi3(t)*	GR:0060473		12	RG241X-RG869	7438930-7731060	Causse et al, 1994
Pi31(t)*	RMg68	GR:0061354; AQCT008	IR64	12	RG869-R887	7731471-11915469	Sallaud et al, 2003
Pi19	RMg38, Pi19(t), Pi14	GR:0060648	Aichi Asahi	12	RM101-RZ670	8826555-13417087	Hayashi et al., 1998
Pi157	Pi157*, Pi157(t)*, RMg47	GR:0060657	Moroberekan	12	RM101-RG9	8826555-18050447	Naqvi et al., 1996
Pi14(t)*			Aichi Asachi	12			Hayashi et al, 1996
Pi-GD-3			Shanhuangzhan	12			Liu et al., 2004
Pi67	Pi67(t)*, RMg46	GR:0060656	Tsuyuake				Wu et al., 1996
Pib1	rMg48, pib1*	GR:0060658	Lemont				Tabien et al., 1996
Piis2	Rb5, RMg7	GR:0060618	Imochi-shirazu				Goto, 1970
Pise2	Rb2, RMg12	GR:0060623	Sensho				Goto, 1970
Pise3	RMg13, Rb3	GR:0060624	Sensho				Goto, 1970

For Peer Review

Supplemental Table 2: Detailed information on homonymous resistance genes to blast.

Gene symbol	Publication order	Proposed name	Synonyms	Chromosome	Gramene Accession	References	Publication by the committee of gene symbolization	Genotype
Pi12	B	*Pi12*	*Pi12*(t), RMg29	12	GR:0060639	Inukai *et al.*, 1996	1996	Moroberek
Pi12	A	*Pi45*	RMg30, *Pi12**, *Pi12*(t)*	12	GR:0060640	Zheng *et al.*, 1996		K80R, Ho zhan
Pi13	A	*Pi46*	RMg32, *Pi13**, *Pi13*(t)*	6	GR:0060642	Hayasaka *et al.*, 1995		Kasalath
Pi13(t)	B	*Pi13*	RMg31, *Pi13*(t)	6	GR:0060641	Pan *et al.*, 1995	1996	Maowangu
Pi14	A	*Pi14*	RMg33, *Pi14*(t)	2	GR:0060643	Pan *et al.*, 1995	1996	Maowangu
Pi14(t)*	B	*Pi47*		12		Hayashi *et al.*, 1996		
Pi21	A	*Pi21*	RMg40	4	GR:0060650	Fukuoka and Okuno, 1997	1999	Owarihatar
Pi21	B	*Pi48*	*Pi21*(t)*, RMg41	12	GR:0060651	Ahn *et al.*, 1997		
Pi24	A	*Pi24*	*Pi24*(t), RMg59	12	AQCT001	Zhuang, *et al.*, 1997	2002	Zhong 156
Pi24(t)	B	*Pi49*	RMg61	1	GR:0061347	Sallaud *et al.*, 2003		IR64
Pi25	A	*Pi25*	*Pi25*(t), RMg60	6	GR:0061186	Zhuang *et al.*, 1997	2002	Gumei 2
Pi25(t)	B	*Pi50*		1		Yang *et al.*, 2001		Sanbangqi
Pi25(t)	C	*Pi51*	RMg62	2	GR:0061348	Sallaud *et al.* 2003		IR64
Pi26	B	*Pi52*		6		Wu *et al.*, 2005		Gumei2
Pi26(t)	A	*Pi26*	Rmg63	5	GR:0061349	Sallaud *et al.*, 2003		Azucena
Pi27	B	*Pi53*		1		Zhu et al., 2004		Q14
Pi27(t)	A	*Pi27*	RMg64	6	GR:0061350	Sallaud et al, 2003		IR64
Pik	A	*Pik*	RMg8	11	GR:0060619	Kiyosawa, 1966	1984	K60, Kan K3
Pikh	B	*Pi54*		11	AAY33493	Sharma et al., 2005		Tetep

For Peer Review

Supplemental Table 3: A list of rice blast resistance QTLs

We searched the literature for publications on Quantitative Trait Loci for resistance to *M. oryzae*. For each publication, we considered the position of the QTL, the position of its flanking markers, the mapping population used, the statistics used to detect QTLs, the statistic results available (LOD score, allele effect, R^2, etc.) and the experimental conditions (strain number, trait measured to evaluate resistance, greenhouse or field conditions). Eighteen studies were analyzed, including two studies published for the first time in this paper. All the QTLs identified were anchored to the rice genome using the gramene position of the flanking markers. When the position was not available, the next flanking marker was used.

We then classified the QTLs in two types: partial and Other (for complete resistance or unknown resistance). First, we considered the phenotype of the parents of the populations used for QTL analysis. We assumed that if one of the parents was completely resistant to the strain used then at least one complete resistance gene is present in the mapping population. In such cases, the completely resistant descendant should be excluded from the analysis (as in the case of pi21, Fukuoka et al., 2001). Because these results are rarely provided in the literature, we decided to consider the QTLs detected in such studies as a mixture of partial and complete resistance. Five of the nine studies that used complete resistance parents allowed the identification of partial resistance QTLs. Finally, field studies without control of strains are likely to detect both partial and complete resistance QTLs. These studies imply mixtures of races with different virulence spectra that can mimic partial resistance. Therefore, in our analysis, we have decided to separate QTLs obtained in the field from QTLs obtained in the greenhouse, where the rice blast strains used for inoculation were controlled.

Finally, because we were interested in measuring the specificity of the MetaQTLs, we developed an index we named BSR for Broad Spectrum Resistance. BSR was estimated by a formula adapted from Sirithunya et al. (2002) as follows:

For Peer Review

1) $$BSR = (\sum_{k=1}^{N} I_k \Big/ \sum_{k=1}^{N} T_k) \times 100$$

where N is the number of publications in which the studied MetaQTL is identified, I is the number of strains for which the QTL was detected in the publication number k, and T is the total number of strains used in the publication number k. For the MetaQTLs detected in field experiments only, the BSR could not be calculated because, most of the time, experiments were performed with natural inocula and the number of strains could not be determined.

For Peer Review

Supplemental Table 4: A list of rice blast resistance MetaQTLs

We summarized the information from the QTLs presented in supplemental Table 2 by a meta-analysis using Biomercator software (Arcade et al., 2004), which computes a meta-analysis based on the method of Goffinet and Gerber (2000). The software requires specification of the position of the QTL and a 95 % confidence interval around this QTL. Because we had converted genetic positions of QTLs into physical positions, we used the physical position of flanking markers to estimate a confidence interval for each QTL. Biomercator estimates, using an adapted Akaike criterion, the mean expected log-likelihood in four different models (1, 2, 3 or 4 QTLs). Minimizing this Akaike criterion, we estimated the number of MetaQTLs on each chromosome.

For Peer Review

CODE	Type	summary of QTLs (QTL CODE)	Environment	Nb study	Nb isolate	Total isolat tested	BSR	Chromosome	Position	Start	End
q1F1	Partial	Wa2	Field	1	Field	Field	nd	1	3 065 397	1 037 293	5 093 501
q1F2	Partial	Wu2	Field	1	Field	Field	nd	1	4 883 872	4 883 872	5 757 288
q1F3	Partial	Wa4	Field	1	Field	Field	nd	1	14 603 974	20 926 224	35 268 683
q1F4	Other	Tab1	Field	1	Field	Field	nd	1	34 764 231	29 512 152	40 016 309
q1G1	Other	C1-Xu4	Greenhouse	2	7	21	0.3333	1	1 460 000	810 000	2 100 000
q1G10	Other	Xu5, P6	Greenhouse	2	2	38	0.0526	1	27 380 000	27 230 000	27 530 000
q1G11	Other	Tal1-C3	Greenhouse	2	2	2	1.0000	1	31 010 000	30 130 000	31 900 000
q1G12	Other	P7-Lo2-Pra1	Greenhouse	3	3	29	0.1034	1	33 410 000	32 310 000	34 520 000
q1G13	Other	C4-P8-Tala1	Greenhouse	3	3	22	0.1364	1	37 110 000	35 630 000	38 580 000
q1G14	Other	P9-Lop2	Greenhouse	2	3	26	0.1154	1	40 470 000	40 020 000	40 920 000
q1G15	Other	Xu6-Tala2	Greenhouse	2	2	23	0.0870	1	43 200 000	42 510 000	43 890 000
q1G2	Other	Wu1-Wa1-Xu1	Greenhouse	3	7	23	0.3043	1	3 370 000	2 980 000	3 760 000
q1G3	Other	Xu2, Xu3	Greenhouse	1	2	20	0.1000	1	3 942 356	2 869 571	4 751 971
q1G4	Other	Sa1-P1-P2	Greenhouse	2	3	24	0.1250	1	5 250 000	5 090 000	5 410 000
q1G5	Other	C2	Greenhouse	1	1	1	1.0000	1	6 670 000	5 910 000	7 440 000
q1G6	Other	Lop1-P3-Wu3	Greenhouse	3	3	28	0.1071	1	8 990 000	8 250 000	9 720 000
q1G7	Partial	P4	Greenhouse	1	1	18	0.0556	1	13 030 000	10 120 000	15 950 000
q1G8	Partial	Wa3	Greenhouse	1	1	1	1.0000	1	17 770 000	14 600 000	20 930 000
q1G9	Partial	P5	Greenhouse	1	2	18	0.1111	1	24 516 230	15 951 432	27 663 069
q2F1	Partial	Wu2	Field	1	Field	Field	nd	2	6 188 215	6 188 215	6 916 027
q2F2	Other	Wa1	Field	1	Field	Field	nd	2	27 483 091	27 032 599	31 106 875
q2F3	Other	Wa2	Field	1	Field	Field	nd	2	31 106 412	27 483 091	31 106 875
q2F4	Other	Tab1	Field	1	Field	Field	nd	2	35 662 167	34 613 990	35 662 167
q2G1	Other	Xu7	Greenhouse	1	1	20	0.0500	2	2 110 000	2 110 000	3 480 000
q2G10	Other	Lop3	Greenhouse	1	1	8	0.1250	2	35 400 000	35 370 000	35 480 000
q2G11	Other	Sa1-Lo3	Greenhouse	2	4	16	0.2500	2	35 660 000	35 610 000	35 710 000
q2G2	Other	P1-P2-P3-Wu1-Lop1	Greenhouse	3	7	28	0.2500	2	4 930 000	4 140 000	5 730 000
q2G3	Other	Lo1	Greenhouse	1	1	10	0.1000	2	11 806 320	11 389 874	12 222 765
q2G4	Other	Xu6-P4-Lop2-Wu3	Greenhouse	4	4	48	0.0833	2	25 450 000	25 090 000	25 800 000
q2G5	Partial	P5	Greenhouse	1	2	18	0.1111	2	24 815 622	22 596 902	27 034 342
q2G6	Partial	P6-Lo2-Tala1	Greenhouse	3	4	31	0.1290	2	27 950 000	27 510 000	28 400 000
q2G7	Partial	P7	Greenhouse	1	1	18	0.0556	2	29 580 000	29 030 000	29 630 000
q2G8	Other	Xu4, Xu5	Greenhouse	1	5	20	0.2500	2	33 140 000	32 350 000	33 930 000
q2G9	Other	Xu1, Xu2, Xu3-C1	Greenhouse	2	10	21	0.4762	2	34 910 000	34 740 000	35 080 000
q3F1	Partial	Wu1	Field	1	Field	Field	nd	3	1 498 934	1 498 934	3 845 896
q3F2	Partial	Wu2	Field	1	Field	Field	nd	3	6 885 711	3 845 990	9 925 432
q3F3	Other	Tab1-Sat1	Field	2	Field	Field	nd	3	25 570 000	24 940 000	26 210 000
q3F4	Other	Pra1	Field	1	Field	Field	nd	3	30 573 744	28 188 518	32 958 969
q3G1	Other	Wa1-P2-Xu1	Greenhouse	3	5	39	0.1282	3	1 050 000	640 000	1 460 000
q3G10	Other	Xu8-C1-P4	Greenhouse	3	3	39	0.0769	3	23 790 000	23 040 000	24 530 000
q3G11	Partial	P8	Greenhouse	1	3	18	0.1667	3	25 080 000	25 080 000	26 680 000
q3G12	Other	P9-Xu3-Tala2	Greenhouse	3	8	41	0.1951	3	31 240 000	29 600 000	32 880 000
q3G14	Other	Lop2-Xu10	Greenhouse	2	4	28	0.1429	3	35 520 000	35 260 000	35 780 000
q3G2	Other	Xu2	Greenhouse	1	1	20	0.0500	3	3 480 000	1 500 000	3 480 000
q3G3	Other	Xu3-P3-Tala3	Greenhouse	3	3	41	0.0732	3	5 680 000	4 710 000	6 650 000
q3G4	Other	Wu3-P1-Xu4-Tala1	Greenhouse	4	4	43	0.0930	3	8 290 000	6 830 000	9 740 000
q3G5	Other	Wu4-Lo1-Lop1-P5	Greenhouse	4	8	38	0.2105	3	11 210 000	10 370 000	12 040 000
q3G6	Other	Xu5-P6	Greenhouse	2	4	38	0.1053	3	15 320 000	10 700 000	15 620 000
q3G7	Partial	P7	Greenhouse	1	2	18	0.1111	3	15 397 478	5 710 277	25 084 678
q3G8	Other	Xu7	Greenhouse	1	1	20	0.0500	3	15 626 610	10 668 254	23 082 184
q3G9	Other	Xu6	Greenhouse	1	2	20	0.1000	3	15 630 000	15 320 000	15 630 000
q4F1	Other	Pra1-Tab1	Field	2	Field	Field	nd	4	9 800 000	8 520 000	11 080 000
q4F2	Other	F2	Field	1	Field	Field	nd	4	19 399 242	9 925 432	28 873 052
q4F3	Other	Wa3-F1-M2	Field	3	Field	Field	nd	4	20 120 000	19 310 000	20 920 000
q4F4	Other	Wa2	Field	1	Field	Field	nd	4	23 410 000	22 320 000	27 260 000
q4F5	Other	M1-Wa1	Field	2	Field	Field	nd	4	31 350 000	30 670 000	32 030 000
q4G1	Partial	Lo1-Tal1-P1	Greenhouse	3	11	29	0.3793	4	8 220 000	5 400 000	11 040 000
q4G10	Partial	Tala2	Greenhouse	1	1	3	0.3333	4	17 677 985	16 662 684	22 321 395
q4G11	Other	Xu2	Greenhouse	1	1	20	0.0500	4	19 525 523	17 677 985	20 157 608
q4G2	Partial	P3, P2-Tala3	Greenhouse	2	3	21	0.1429	4	17 430 000	15 410 000	19 440 000
q4G3	Other	Xu1	Greenhouse	1	1	20	0.0500	4	20 156 485	17 681 381	22 321 395
q4G4	Other	Lop1-Wu1-P5, P4	Greenhouse	3	4	28	0.1429	4	21 090 000	20 850 000	21 320 000
q4G5	Partial	P7-Tala5	Greenhouse	2	3	21	0.1429	4	25 140 000	24 140 000	26 140 000
q4G6	Partial	Lop2-P8-Tala6	Greenhouse	3	7	29	0.2414	4	32 400 000	32 120 000	32 690 000
q4G7	Partial	P9	Greenhouse	1	1	18	0.0556	4	32 465 456	27 260 624	32 465 456
q4G8	Partial	B81-P10, P11-Tala4	Greenhouse	3	6	24	0.2500	4	34 470 000	33 900 000	35 030 000
q4G9	Partial	Tala1	Greenhouse	1	1	3	0.3333	4	16 662 684	8 595 185	16 662 684
q5F1	Other	Pra2-Tab1-Pra1	Field	2	Field	Field	nd	5	25 310 000	24 050 000	26 580 000
q5G1	Other	P1	Greenhouse	1	1	18	0.0556	5	470 000	470 000	1 840 000
q5G2	Other	Sa1	Greenhouse	1	1	6	0.1667	5	2 070 000	1 840 000	2 070 000
q5G3	Partial	P2	Greenhouse	1	1	18	0.0556	5	4 090 000	1 840 000	4 090 000
q5G4	Other	Xu1	Greenhouse	1	1	20	0.0500	5	11 020 000	10 760 000	11 590 000
q5G5	Partial	P3-Lo1-Wa1-Tala1	Greenhouse	4	7	32	0.2188	5	19 540 000	15 470 000	23 600 000
q5G6	Partial	P4-Tala2	Greenhouse	2	2	21	0.0952	5	24 240 000	23 510 000	24 970 000
q5G7	Partial	P5	Greenhouse	1	1	18	0.0556	5	28 830 000	28 830 000	29 260 000
q6F1	Other	Si1, Si2	Field	1	Field	Field	nd	6	10 020 000	8 640 000	11 400 000
q6F2	Other	Tab1	Field	1	Field	Field	nd	6	28 827 008	26 708 549	30 945 466
q6G1	Partial	P1	Greenhouse	1	4	18	0.2222	6	1 822 651	1 822 651	2 561 213
q6G10	Other	Xu7, Xu8	Greenhouse	1	2	20	0.1000	6	27 612 443	27 252 300	28 964 348
q6G11	Other	Xu9-Pra1, Pra2	Greenhouse	2	3	21	0.1429	6	29 800 000	29 210 000	30 380 000
q6G12	Other	Lop2	Greenhouse	1	1	8	0.1250	6	30 910 000	30 860 000	30 950 000
q6G13	Partial	Tala3	Greenhouse	1	1	3	0.3333	6	26 238 616	19 332 906	26 708 198
q6G2	Other	Xu1	Greenhouse	1	1	20	0.0500	6	3 180 072	2 561 213	4 160 454
q6G3	Other	Xu2	Greenhouse	1	1	20	0.0500	6	4 234 228	3 168 547	5 425 498
q6G4	Other	Tal3-P3-Sa1-Xu3, Xu4	Greenhouse	4	6	45	0.1333	6	6 100 000	5 490 000	6 710 000
q6G5	Partial	P2	Greenhouse	1	1	18	0.0556	6	6 283 401	5 425 631	6 927 624
q6G6	Partial	P4, P5	Greenhouse	1	2	18	0.1111	6	6 999 318	6 999 318	26 238 407
q6G7	Other	Lop1-Wa1-Xu5	Greenhouse	3	7	29	0.2414	6	12 580 000	10 020 000	15 130 000
q6G8	Partial	Wa2-P6-Tala2, Tala1	Greenhouse	3	5	22	0.2273	6	21 500 000	18 620 000	24 380 000
q6G9	Other	Tal1, Tal2-P8, P7-Xu6-Tala4	Greenhouse	4	7	44	0.1591	6	26 710 000	26 550 000	26 880 000
q7F1	Partial	Wu1	Field	1	Field	Field	nd	7	15 410 000	15 410 000	21 500 000
q7F2	Other	Tab1-Si2	Field	2	Field	Field	nd	7	18 330 000	17 520 000	18 680 000
q7F3	Other	Si1	Field	1	Field	Field	nd	7	22 030 000	21 870 000	22 190 000
q7G1	Other	Xu5-C1	Greenhouse	2	2	21	0.0952	7	3 300 000	2 250 000	4 340 000
q7G10	Other	Xu3-Tal2-P8-Tala1, Tala2	Greenhouse	4	6	42	0.1429	7	26 940 000	26 550 000	27 330 000
q7G11	Other	Xu1-Wa1-Tala4	Greenhouse	3	3	24	0.1250	7	29 460 000	29 400 000	29 530 000
q7G12	Other	Xu2	Greenhouse	1	1	20	0.0500	7	29 339 144	27 158 350	29 473 794
q7G2	Other	Lo1-Tal1-P1-Tala3	Greenhouse	4	5	32	0.1563	7	7 380 000	5 920 000	8 840 000
q7G3	Partial	P2	Greenhouse	1	2	18	0.1111	7	8 255 634	852 711	16 871 309
q7G4	Partial	Wu1	Greenhouse	1	1	2	0.5000	7	15 410 000	15 410 000	21 500 000
q7G5	Other	Si1-P3	Greenhouse	2	17	33	0.5152	7	22 040 000	21 880 000	22 190 000
q7G6	Partial	P4	Greenhouse	1	1	18	0.0556	7	22 247 245	20 345 714	22 247 245
q7G7	Partial	P5	Greenhouse	1	1	18	0.0556	7	24 084 476	22 251 048	25 471 987
q7G8	Partial	P7	Greenhouse	1	4	18	0.2222	7	25 471 987	22 251 048	25 471 987
q7G9	Other	P6-Xu4-C2	Greenhouse	3	4	39	0.1026	7	25 780 000	25 380 000	26 170 000
q8G1	Other	Xu1-Wu1, Wu2, Wu3-Lop1-P1-Wa1-C1-Tala3	Greenhouse	7	12	53	0.2264	8	4 790 000	3 810 000	5 770 000
q8G10	Partial	P5	Greenhouse	1	1	18	0.0556	8	27 700 258	27 605 406	27 700 258
q8G2	Partial	P2	Greenhouse	1	15	18	0.8333	8	7 129 486	0	7 129 486
q8G3	Other	Sa1-Lop2-Xu2	Greenhouse	3	7	34	0.2059	8	9 910 000	7 190 000	12 630 000
q8G4	Other	P3-Xu3	Greenhouse	2	5	38	0.1316	8	13 930 000	12 120 000	15 730 000
q8G5	Other	Xu4	Greenhouse	1	2	20	0.1000	8	16 440 198	16 440 198	18 921 584
q8G6	Other	Xu5	Greenhouse	1	1	20	0.0500	8	18 921 584	13 800 297	19 964 404
q8G7	Other	Xu6	Greenhouse	1	1	20	0.0500	8	19 964 404	18 922 457	19 964 404
q8G8	Other	Xu7-P4-Lo1-Lop3-Tala1	Greenhouse	5	10	59	0.1695	8	20 600 000	20 340 000	20 870 000
q8G9	Partial	P6-Tala2	Greenhouse	2	5	21	0.2381	8	26 290 000	24 880 000	27 690 000

q9F1	Other	Tab1-F1	Field	2	Field	Field	nd	9	9 430 000	7 860 000	11 000 000
q9F2	Other	Pra3	Field	1	Field	Field	nd	9	18 014 586	15 547 564	20 481 607
q9F3	Other	Pra1	Field	1	Field	Field	nd	9	19 559 821	18 514 004	20 605 638
q9F4	Other	Pra2	Field	1	Field	Field	nd	9	21 401 653	20 608 559	22 194 746
q9G1	Partial	P1	Greenhouse	1	6	18	0.3333	9	6 020 000	6 020 000	8 350 000
q9G2	Other	Si1	Greenhouse	1	14	15	0.9333	9	8 780 000	8 350 000	9 220 000
q9G3	Other	C3-P2	Greenhouse	2	2	19	0.1053	9	11 780 000	10 060 000	13 500 000
q9G4	Other	Lop1-P3-Xu1	Greenhouse	3	4	46	0.0870	9	16 060 000	14 580 000	17 540 000
q9G5	Other	Xu3	Greenhouse	1	1	20	0.0500	9	18 264 945	17 719 823	18 810 067
q9G6	Other	C2-Xu2-Lop2-Tal1	Greenhouse	4	7	30	0.2333	9	18 560 000	17 900 000	18 810 000
q9G7	Other	Xu4-P4-Lo1	Greenhouse	3	10	46	0.2174	9	19 510 000	19 290 000	19 730 000
q9G8	Other	Xu5-C1-P5	Greenhouse	3	3	39	0.0769	9	20 170 000	20 170 000	21 530 000
q9G9	Other	Xu6	Greenhouse	1	1	20	0.0500	9	22 300 000	22 200 000	22 720 000
q10G1	Other	Xu3-P1	Greenhouse	2	3	38	0.0789	10	850 000	1 000 000	5 100 000
q10G2	Other	Xu4	Greenhouse	1	2	20	0.1000	10	6 391 617	359 168	12 424 066
q10G3	Other	Xu5	Greenhouse	1	2	20	0.1000	10	6 450 000	5 100 000	7 100 000
q10G4	Other	Xu6, Xu7	Greenhouse	1	2	20	0.1000	10	7 101 837	5 102 434	10 305 714
q10G5	Other	Xu1, Xu2	Greenhouse	1	3	20	0.1500	10	9 361 244	359 168	9 361 244
q10G6	Other	Lo1-Xu8-P2	Greenhouse	3	3	48	0.0625	10	9 360 000	7 780 000	13 500 000
q10G7	Partial	P3	Greenhouse	1	8	18	0.4444	10	12 675 370	11 455 470	13 895 269
q10G8	Other	Sa1-P4-Wu1	Greenhouse	3	3	25	0.1200	10	20 490 000	19 910 000	21 070 000
q11F1	Other	Sat1-Wa2-Wu1	Field	3	Field	Field	nd	11	17 770 000	15 290 000	21 610 000
q11F2	Other	Z1-Wa3-Tab1-Pra1	Field	4	Field	Field	nd	11	20 950 000	19 370 000	22 520 000
q11G1	Other	Sa1-P1	Greenhouse	2	3	24	0.1250	11	1 860 000	880 000	2 830 000
q11G10	Other	Xu2	Greenhouse	1	5	20	0.2500	11	28 376 959	28 202 357	28 376 959
q11G2	Other	Xu5-Tal1	Greenhouse	2	2	21	0.0952	11	6 690 000	5 250 000	8 130 000
q11G3	Partial	Lop1	Greenhouse	1	3	8	0.3750	11	8 330 000	7 690 000	8 970 000
q11G4	Partial	Wu3	Greenhouse	1	1	2	0.5000	11	10 110 000	8 980 000	10 110 000
q11G5	Partial	Wa1-P2-Lop2-Lo1-Wu1	Greenhouse	5	5	39	0.1282	11	18 670 000	18 420 000	18 930 000
q11G6	Partial	P3	Greenhouse	1	2	18	0.1111	11	21 390 873	21 390 873	24 163 895
q11G7	Other	Wu4-Xu4-P4-Lo2	Greenhouse	4	6	50	0.1200	11	24 520 000	23 300 000	25 750 000
q11G8	Partial	P5-Lop3	Greenhouse	2	4	26	0.1538	11	27 160 000	27 100 000	27 230 000
q11G9	Other	Xu3	Greenhouse	1	2	20	0.1000	11	28 202 357	24 163 895	28 462 103
q12F1	Other	Wa1-Tab1	Field	2	Field	Field	nd	12	1 600 000	1 590 000	5 800 000
q12F2	Other	Tab2-Wa4	Field	2	Field	Field	nd	12	5 960 000	4 020 000	7 900 000
q12F3	Other	F1-Pra1	Field	2	Field	Field	nd	12	11 350 000	6 970 000	15 740 000
q12F4	Other	Wa3	Field	1	Field	Field	nd	12	26 020 000	26 020 000	27 490 000
q12G1	Partial	P2	Greenhouse	1	1	18	0.0556	12	290 513	290 513	2 244 334
q12G11	Other	Xu5	Greenhouse	1	4	20	0.2000	12	19 628 407	5 804 339	24 487 487
q12G12	Other	P6-Xu2	Greenhouse	2	3	38	0.0789	12	25 890 000	25 150 000	26 630 000
q12G13	Other	Xu3	Greenhouse	1	1	20	0.0500	12	24 487 487	18 867 450	24 588 513
q12G14	Other	Xu1	Greenhouse	1	1	20	0.0500	12	26 991 375	26 107 904	27 488 769
q12G2	Other	P1-Xu11	Greenhouse	2	2	38	0.0526	12	1 010 000	680 000	1 340 000
q12G3	Other	Xu10	Greenhouse	1	1	20	0.0500	12	3 185 384	1 594 835	4 102 373
q12G4	Other	P3-Xu9	Greenhouse	2	2	38	0.0526	12	4 100 000	3 670 000	4 530 000
q12G5	Other	Xu8	Greenhouse	1	1	20	0.0500	12	4 472 117	3 185 384	5 758 850
q12G6	Other	Xu7-Tala4	Greenhouse	2	2	23	0.0870	12	5 840 000	5 010 000	6 670 000
q12G7	Other	Xu6	Greenhouse	1	2	20	0.1000	12	5 804 339	5 758 288	19 631 950
q12G8	Other	Sa1-Lop1-B81-Pra2-P4	Greenhouse	5	10	36	0.2778	12	10 120 000	6 890 000	10 520 000
q12G9	Other	Wa2-Sa2-P5-Tal2, Tal1, Tal3-Lop2-Tala1, Tala2, Tala3-Xu4	Greenhouse	7	14	57	0.2456	12	15 550 000	14 630 000	16 470 000

For Peer Review

Literature cited in Supplemental Tables.

Ahn, S.N., Kim, Y.K., Han, S.S., Choi, H.C., Moon, H.P., and McCouch, S.R. 1996. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast. Rice Genet. Newslet. 13:74.

Arcade, A., Labourdette, A., Falque, M., Mangin, B., Chardon, F., Charcosset, A., and Joets, J. 2004. BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. Bioinformatics 20:2324-2326.

Bai, J., Pennill, L.A., Ning, J., Lee, S.W., Ramalingam, J., Webb, C.A., Zhao, B., Sun, Q., Nelson, J.C., Leach, J.E., and Hulbert, S.H. 2002. Diversity in Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes in Cereals. Genome Res. 12:1871-1884.

Barman, S.R., Gowda, M., Venu, R.C., and Chattoo, B.B. 2004. Identification of a major blast resistance gene in the rice cultivar 'Tetep'. Plant Breeding 123:300-302.

Campbell, M.A., Chen, D., and Ronald, P.C. 2004. Development of co-dominant amplified polymorphic sequence markers in rice that flank the *Magnaporthe grisea* resistance gene *Pi7*(t) in recombinant inbred line 29. Phytopathology, 94:302-307.

Chauhan, R.S., Farman, M.L., Zhang, H.B., and Leong, S.A. 2002. Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39*(t), that corresponds to the avirulence gene *AVR1-CO39* of *Magnaporthe grisea*. Mol. Genet. Geno. 267: 603-612.

Chen, D.H., Vina, M.D., Inukai, T., Mackill, D.J., Ronald, P.C., and Nelson, R.J. 1999. Molecular mapping of the blast resistance gene, *Pi44*(t), in a line derived from a durably resistant rice cultivar. Theor. Appl. Genet. 98:1046-1053.

Darvasi, A., and Soller, M. 1997. A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. Behavioural Genetics 27:125-132.

Glass, G.V. 1976. Primary, secondary, and meta-analysis of research. Educational Researcher

For Peer Review

5:3-8.

Goto, I. 1976. Genetic studies on resistance of rice plant to blast fungus. II. Difference in resistance to the blast disease between Fukunishiki and its parental cultivar, Zenith. Ann. Phytopath. Soc. Jap. 42:253-260.

Gowda, M., Roy-Barman, S., and Chattoo, B.B. 2006. Molecular mapping of a novel blast resistance gene *Pi38* in rice using SSLP and AFLP markers. Plant Breed. 125:596-599.

Hayasaka, H., Shimano, T., Ebana, K., Nagamura, Y., Yano, M., Sasaki, T., and Matsunaga, K. 1995. RELP mapping of a rice blast resistance gene *Pi-b*. Breed. Sci. 45:92.

Hayashi, N., Ando, I., and Imbe, T. 1998. Identification of a new resistance gene to a Chinese blast fungus isolate in the Japanese rice cultivar Aichi Asahi. Phytopathology 88:822-827.

Hayashi, N., Ando, I., and Naito, H. 1996. Gene analysis of a new blast resistance in the paddy rice variety, Aichi Asahi. Breed. Sci. 46:168 (In Japanese).

Hsieh, S.C. 1976. Recent advances in rice breeding and genetical studies in Taiwan. Scientific Agricult. 4:48-68.

Imbe, T., and Matsumoto, S. 1985. Inheritance of resistance of rice varieties to the blast fungus strains virulent of the variety Reiho. Jap. J. Breed. 35:332-339. (in Japanese, English abstract).

Imbe, T., Oba, S., Yanoria, M.J.T., and Tsunematsu, H. 1997. A new gene for blast resistance in rice cultivar, IR24. Rice Genet. Newslet. 14:60-61.

International, C.A.B., Distribution Maps of Plant Diseases, Map 51. CABI, Wallingford, UK.

Inukai, T., Mackill, D.J., Bonman, J.M., Sarkarung, S., Zeigler, R., Nelson, R., Takamure, I., and Kinoshita, T. 1992. Blast resistance genes *Pi2*(t) and *Pi-z* may be allelic. Rice Genet. Newslet. 9:90-92.

Inukai, T., Nelson, R.J., Zeigler, R.S., Sarkarung, S., Mackill, D.J., Bonman, J.M., Takamure, I., and Kinoshita, T. 1994. Allelism of blast resistance genes in near-isogenic lines of rice.

For Peer Review

Phytopathology, 84:1278-1283.

Inukai, T., Zeigler, R.S., Sarkarung, S., Bronson, M., Dung, L.V., Kinoshita, T., and Nelson, R.J. 1996. Development of pre-isogenic lines for rice blast-resistance by marker-aided selection from a recombinant inbred population. Theor. Appl. Genet. 93:560-567.

Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J. 19:4004-4014.

Kinoshita, T., and Kiyosawa, S. 1997. Some considerations on linkage relationships between *Pii* and *Piz* in the blast resistance of rice. Rice Genet. Newslet. 14:57-59.

Kiyosawa, S. 1969. Inheritance of resistance of rice varieties to a Philippine fungus strain of *Pyricularia oryzae*. Jap. J. Breed. 19:61-73.

Kiyosawa, S. 1972. Genetics of blast resistance. Rice Breeding, Manila, Philippines, pp. 203-225.

Kiyosawa, S., Mackill, D.S., Bonman, J.M., Tanak, Y., and Ling, Z.Z. 1986. An attempt of classification of world's rice varieties based on reaction pattern to blast fungus strains. Bull. Nat. Inst. Agrobio. Resources.2:13-23.

Kiyosawa, S., and Murty, V.V.S. 1969. The inheritance of blast-resistance in Indian rice variety, HR-22. Jap. J. Breed. 19:269-276.

Li, C., Yang, S., Wu, L., and Wan, J. 2006. The inductive activation of the promoter of *Pib* gene. Hereditas 28:689-694.

Liu, X., Yang, Q., Lin, F., Hua, L., Wang, C., Wang, L., and Pan, Q. 2007. Identification and fine mapping of *Pi39*(t), a major gene conferring the broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae*. Mol. Genet. Geno. 278:DOI: 10.1007/s00438-007-0258-5.

Lin F, Chen S, Que Z, Wang L, Liu X, Pan Q. 2007. The blast resistance gene *pi37* encodes a nucleotide binding site leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. Genetics 177:1871-1880.

For Peer Review

Mackill, D.J., and Bonman, J.M. 1992. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. Phytopathology 82:746-749.

Nakamura, S., Asakawa, S., Ohmido, N., Fukui, K., Shimizu, N., and Kawasaki, S. 1997. Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta²* using a highly representative rice BAC library. Mol. Gen. Genet. 254:611-620.

Naqvi, N.I., and Chattoo, B.B. 1996. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. Genome 39:26-30.

Pan, Q., Wang, L., Ikehashi, H., and Tanisaka, T. 1996. Identification of a new blast resistance gene in the indica rice cultivar Kasalath using Japanese differential cultivars and isozyme markers. Phytopathology 86:1071-1075.

Pan, Q.H., Tanisaka, T., and Ikehashi, H. 1995. Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice. IV. Gene analysis for the blast resistance of a indica variety Kasalath. Breed. Sci. 45:170.

Pan, Q.H., Tanisaka, T., and Ikehashi, H. 1997. Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice VII. Gene analysis for the blast resistance of Indian native cultivar, Aus 373. Breed. Sci. 47:35 (In Japanese).

Tabien, R.E. 1996. Utilization of recombinant inbred lines in tagging blast resistance genes for a marker-assisted selection scheme in rice. Phd degree Thesis, Texas A & M University, College Station, Texas, USA. 190 pp.

Tabien, R.E., Li, Z., Paterson, A.H., Marchetti, M.A., Stansel, J.W., and Pinson, S.R.M. 2000. Mapping of four major rice blast resistance genes from 'Lemont' and 'Teqing' and evaluation of their combinatorial effect for field resistance. Theor. Appl. Genet. 101:1215-1225.

Wu, K.S., Martinez, C., Lentini, Z., Tohme, J., Chumley, F.G., Scolnik, P.A., and Valent, B. 1996.

For Peer Review

Cloning a blast resistance gene by chromosome walking, Rice Genetics, III, Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium. IRRI, Manila, Philippines, pp. 669-674.

Yamasaki, Y., and Kiyosawa, S. 1966. Studies on inheritance of the resistance of rice varieties to blast. 1. Inheritance of the resistance of Japanese varieties to several strains of the fungus. Bull. Nat. Inst. Agric. Sci. D14:39-69 (in Japanese).

Yang, Q., Yang, P., Wang, Q., Liu, J., Yan, B., Li, J., and Huang, X. 2001. Cloning and sequencing of disease resistance gene analogues in rice (*Oryza sativa* L.). Chinese J. Rice Sci. 15:241-247. (In Chinese).

Yang, Q.Z., Saito, K., Yang, P.W., Wang, Q., Sunohara, Y., Zheng, F.P., Ye, C.R., Li, J.R., and Kato, A. 2001. Molecular mapping of a new blast resistance gene *Pi25*(t) possessed in a Japonica rice cultivar, *Oryza sativa* L cv Yunxi 2. Proceedings of the 1st rice blast congress in China, Kunming. pp. 49-55.

Zenbayashi-Sawata, K., Fukuoka, S., Katagiri, S., Fujisawa, M., Matsumoto, T., Ashizawa, T., and Koizumi, S. 2007. Genetic and Physical Mapping of the Partial Resistance Gene, *Pi34*, to Blast in Rice. Phytopathology 97:598-602.

Zheng, K.L., Zhuang, J.Y., Lu, J., Qian, H.R., and Lin, H.X. 1996. Identification of DNA markers tightly linked to blast resistance genes in rice, Rice Genetics, III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium. IRRI, Manila, Philippines, pp. 145-150.

Zhou, B., Dolan, M., Sakai, H., and Wang, G.L. 2007. The genomic dynamics and evolutionary mechanism of the *Pi2/9* locus in rice. Mol. Plant-Microbe Interac. 20:63-71.

Zhou, J.H., Wang, J.L., Xu, J.C., Lei, C.L., and Ling, Z.Z. 2004. Identification and mapping of a rice blast resistance gene *Pi-g*(t) in the cultivar Guangchangzhan. Plant Pathol. 53:191-196.

Zhou, T., Wang, Y., Chen, J.Q., Araki, H., Jing, Z., Jiang, K., Shen, J., and Tian, D. 2004. Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of

For Peer Review

divergent non-TIR NBS-LRR genes. Mol. Genet. Genomics 271:402-415.

Zhu, M., Wang, L., and Pan, Q. 2004. Identification and characterization of a new blast resistance gene located on rice chromosome 1 through linkage and differential analyses. Phytopathology 94:515-519.

Zhuang, J.Y., Chai, R.Y., Ma, W.B., Lu, J., Jin, M.Z., and Zheng, K.L. 1997. Genetic analysis of the blast resistance at vegetative and reproductive stages in rice. Rice Genet. Newslet. 14:62-64.

Zhuang, J.Y., Wu, J.L., Fan, Y.Y., Rao, Z.M., and Zheng, K.L. 2001. Genetic drag between a blast resistance gene and QTL conditioning yield trait detected in a recombinant inbred line population in rice. Rice Genet. Newslet. 18:69-70.

For Peer Review

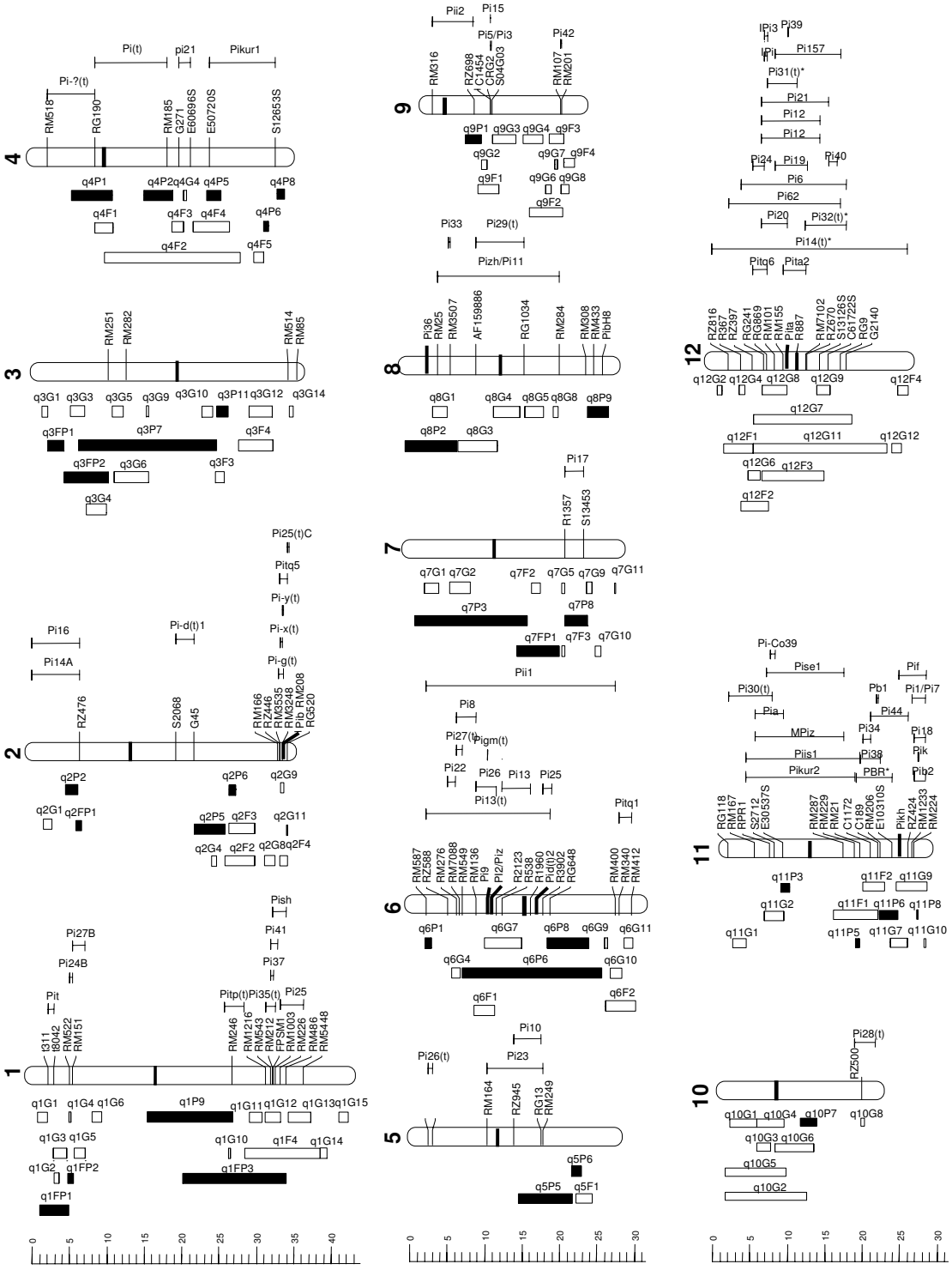
Figure 1 – Ballini et al. -MPMI

Figure 1: Physical Map of Resistance Genes and MetaQTLs of Resistance to Rice Blast.

Chromosome size is shown by the scale on the left (in million base pairs) based on Gramene positions and names of markers are indicated by labeled bars on the chromosomes. The positions are indicated to the right of each chromosome. MetaQTLs are symbolized by filled (Partial resist resistance MetaQTLs) bars. Field QTLs and Greenhouse QTLs are analyzed separately: the le represent Field, Greenhouse and Partial, respectively.

MetaQTLs represented by only one study and one repetition are not represented in this Figure; t specific to the population used or to the experiment.

For Peer Review


4
Pi(t)
pi21
Pikur1
Pi-?(t)
RM518
RG190
RM185
G271
E60696S
E50720S
S12653S
q4P1
q4P2
q4G4
q4P5
q4P8
q4F1
q4F3
q4F4
q4P6
q4F2
q4F5
3
RM251
RM282
RM514
RM85
q3G1
q3G3
q3G5
q3G9
q3G10
q3P11
q3G12
q3G14
q3FP1
q3P7
q3F4
q3FP2
q3G6
q3F3
q3G4
2
Pi25(t)C
Pitq5
Pi-y(t)
Pi16
Pi-d(t)1
Pi-x(t)
Pi14A
Pi-g(t)
RZ476
S2068
G45
RM166
RZ445
RM3535
RM3248
Pib
RM208
RG520
q2P2
q2P6
q2G9
q2G1
q2FP1
q2P5
q2F3
q2G11
q2G4
q2F2
q2G8
q2F4
1
Pish
Pi27B
Pi41
Pi24B
Pi37
Pit
Pitp(t)
Pi35(t)
Pi25
t311
t8042
RM522
RM151
RM246
RM1216
RM543
RM212
RM204
RM1003
RM226
RM486
RM5448
q1G1
q1G4
q1G6
q1P9
q1G11
q1G12
q1G13
q1G15
q1G3
q1G5
q1G10
q1F4
q1G14
q1G2
q1FP2
q1FP3
q1FP1
0 5 10 15 20 25 30 35 40
9
Pii2
Pi15
Pi5/Pi3
Pi42
RM316
RZ698
C1454
CRG2
S04G03
RM107
RM201
q9P1
q9G3
q9G4
q9F3
q9G2
q9G7
q9F4
q9F1
q9G6
q9G8
q9F2
Pi33
Pi29(t)
Pizh/Pi11
8
Pi36
RM25
RM3507
AF159886
RG1034
RM284
RM308
RM433
PibH8
q8G1
q8G4
q8G5
q8G8
q8P9
q8P2
q8G3
7
Pi17
R1357
S13453
q7G1
q7G2
q7F2
q7G5
q7G9
q7G11
q7P3
q7P8
q7FP1
q7F3
q7G10
Pii1
Pi8
Pi27(t)
Pigm(t)
Pi22
Pi26
Pi13
Pi25
Pi13(t)
Pitq1
6
RM587
RZ588
RM276
RM7088
RM549
RM136
Pi9
Pi2/Piz
R2123
R538
R1960
Pid(t)2
R3902
RG648
RM400
RM340
RM412
q6P1
q6G7
q6P8
q6G9
q6G11
q6G4
q6P6
q6G10
q6F1
q6F2
5
Pi10
Pi26(t)
Pi23
RM164
RZ945
RG13
RM249
q5P6
q5P5
q5F1
0 5 10 15 20 25 30
12
RZ816
R367
RZ397
RG241
RG869
RM101
RM155
Pita
R887
RM7102
RZ670
S13126S
C61722S
RG9
G2140
q12G2
q12G4
q12G8
q12G9
q12F4
q12G7
q12F1
q12G11
q12G12
q12G6
q12F3
q12F2
11
Pi-Co39
Pise1
Pif
Pi30(t)
Pb1
Pi1/Pi7
Pia
Pi44
MPiz
Pi34
Pi18
Piis1
Pi38
Pik
Pikur2
PBR*
Pib2
RG118
RM167
RPR1
S2712
E30537S
RM287
RM229
RM21
C1172
C189
RM206
E10310S
Pikh
RZ424
RM1233
RM224
q11P3
q11F2
q11G9
q11G2
q11F1
q11P6
q11P8
q11G1
q11P5
q11G7
q11G10
10
Pi28(t)
RZ500
q10G1
q10G4
q10P7
q10G8
q10G3
q10G6
q10G5
q10G2
0 5 10 15 20 25 30

Gène	Chr	Accession NCBI	AVR cloné	Interaction directe	Type	Références
Pib	2	AB013448	Non	ND	NBS-LRR	Wang *et al.,* 1999
Pita	12	AF207842	Metalloprotease	Oui	NBS-LRR	Bryan *et al*., 2000
Pikh	11	AY914077	Non	ND	NBS-LRR	Sharma *et al*., 2005
Pi9	6	ABB88855	Non	ND	NBS-LRR	Qu *et al*., 2006
Pi2/Pizt	6	ABC94599/ DQ352040	Non	ND	NBS-LRR	Zhou *et al*., 2006
Pid2	6		Non	ND	B lectin recepteur Ser/Thr kinase	Chen *et al*., 2006
Pi36	8		Non	ND	NBS-LRR	Liu *et al*., 2007
Pi37	1		Non	ND	NBS-LRR	Lin *et al*., 2007

Gène	Taille (aa)	Localisation	Expression	Structure du Locus	Allèles	Origine
Pib	1251	ND	circadienne, induite par le stress	2 gènes	3 mutants sensibles	indica
Pita	928	Cytoplasmique	Constitutive	2 gènes	1 aa chez indica sensible, 5 aa chez japonica sensible	indica
Pikh	330	ND	induite, différentiel Résistant/Sensible	6 gènes	1 substitution dans le promoteur	indica
Pi9	1032	ND	Constitutive	9 gènes	ND	*Oryza minuta*
Pi2/Pizt	1032-1033	ND	Constitutive	9 gènes	8 aa entre *Pi2* et *Pizt*	indica
Pid2	825	Membranaire	Constitutive	simple	1 aa chez les sensibles	indica
Pi36	1056	ND	Constitutive	simple	ND	indica
Pi37	1291	Cytoplasmique	Constitutive	4 gènes	ND	indica

Tableau 1.2. Gènes de résistance à la pyriculariose clonés.

I.2.4 Les gènes de résistance à la pyriculariose clonés

Plusieurs études ont déjà fait le bilan des gènes de résistance à la pyriculariose ayant été clonés (Zhou *et al.*, 2007 ; Dai *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007), de ce fait seules quelques caractéristiques de ces gènes seront abordées dans ce chapitre. Le premier gène de résistance à la pyriculariose a été cloné en 1999 (Wang *et al.*). Depuis, le clonage de six autres gènes a été publié : *Pib* (Wang *et al.*, 1999), *Pita* (Bryan *et al.*, 2000), *Pikh* (Sharma *et al.*, 2005), *Pi9* (Qu *et al.*, 2006), *Pi2/Piz-t* (Zhou *et al.*, 2006), *Pid2* (Chen *et al.*, 2006) et *Pi36* (Liu *et al.*, 2007) (Tableau 1.2). Deux autres gènes sont clonés mais pas encore publié : *pi21* (Okuno, communication personnelle) et *Pish* (Takahashi *et al.*, communication personnelle).

A part *Pid2* qui code pour une Serine/Thréonine Kinase membranaire, tous les autres gènes de résistance à la pyriculariose clonés sont de type NBS-LRR. Au contraire des NBS-LRR d'*A. thaliana*, ils se composent de plusieurs exons comme la plupart des NBS-LRR du riz (Bai *et al.*, 2002). *Pita* et *Pikh* se composent de deux exons, *Pib*, *Pi2* et *Pi9* de trois exons et *Pi36* de cinq exons. Un résultat notable est que toutes ces NBS-LRR semblent avoir des motifs LRR assez peu conservés par rapport au motif classique (LxxLxLxxL). Ce domaine est d'ailleurs plutôt qualifié de Leucine Rich Domain (LRD ; Bryan *et al.*, 2000). Une seule autre NBS-LRR a été clonée chez le riz, elle est codée par le gène *Xa1* qui confère la résistance à *Xanthomonas oryzae*. Cette dernière présente plusieurs îlots de motifs LRR bien conservés au sein d'une région riche en Leucine. Cependant, la mauvaise conservation des domaines LRR est plus une règle qu'une exception chez le riz (Bai *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2004). En outre, cette particularité ne semble pas empêcher les interactions recepteur-ligand puisque une interaction directe entre le produit du gène *Pita* et le produit du gène d'avirulence *AvrPita* a été démontrée (Jia *et al.*, 2000). Et cette variabilité pourrait jouer un rôle important dans la spécificité de la reconnaissance.

L'expression de ces différents gènes a été étudiée au cours de l'infection par *M. oryzae*. Cependant, aucune règle ne peut en être déduite. La plupart des gènes semblent avoir une expression constitutive sauf *Pikh* dont l'expression serait induite par l'agent pathogène (Sharma *et al.*, 2005) et *Pib* qui présente une expression régie par un cycle circadien et qui est induit par des stress biotiques et abiotiques (Wang *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2006).

Comme beaucoup de gènes de résistance, la plupart de ces gènes sont en cluster à l'exception de *Pid2* et *Pi36*. Le nombre de copies au sein d'un cluster peut changer d'une variété à l'autre, notamment entre variétés sensibles et résistantes. Par exemple pour *Pib,* le génotype résistant Tohoku IL9 présente deux copies dont une seule est fonctionnelle alors que le génotype sensible Nipponbare n'a qu'une seule copie non fonctionnelle pour la résistance (Wang *et al.*,

1999). Au locus *Pi2/Pi9* le nombre de copies de NBS-LRR varie entre quatre et neuf selon les génotypes (Zhou *et al.*, 2007).

L'étude de certains mutants sensibles a permis de mettre en évidence l'importance pour la résistance de certains domaines protéiques. Une mutation dans le LRD de *Pi2* et *Pizt* supprime la résistance (Zhou *et al.*, 2006). Une mutation dans les domaines NBS, LRD et C-terminal supprime la résistance du gène *Pib* (Kim *et al.*, 2005). Au total 3 allèles sensibles naturels de *Pita* ont été répertoriés par Jia *et al.* (2003). De manière surprenante, c'est la région N-terminale qui présente le plus de substitutions alors qu'on pouvait s'attendre à ce que la région C-terminal, qui interagit directement avec AvrPita, soit moins conservée. Une mutation dans le promoteur de *Pikh* conduit à un allèle sensible (Sharma *et al.*, 2005). Une mutation dans le domaine trans-membranaire de *Pid2* supprime la résistance (Chen *et al.*, 2006).

I.2.5 Le pathosystème *O. sativa/M. oryzae,* modèle d'étude des interactions céréales/champignons phytopathogènes.

M. oryzae est un champignon facilement manipulable au laboratoire (croissance rapide sur milieu artificiel, reproductions sexuée et asexuée contrôlées). En outre, il s'est avéré que les outils de biologie moléculaire ont pu lui être appliqué rapidement (banques d'ADN, cartes génétiques et physiques, transformation,…) et son génome fut le premier séquencé chez les champignons phytopathogènes (Dean *et al.*, 2005). L'emploi de tous ces outils a permis, entre autres, de générer un grand nombre de mutants affectés dans leur pouvoir pathogène (Talbot, 2003). *M. oryzae* apparaît donc comme un bon modèle d'étude pour comprendre les interactions plante/champignon phytopathogène (Valent, 1990 ; Veneault-Fourrey et Talbot, 2005).

Par ailleurs, le riz est actuellement la plante modèle des monocotylédones. En effet, le riz est à la fois une plante à petit génome, ce qui a facilité son séquençage complet, une plante diploïde et autogame, ce qui simplifie son étude génétique, et une plante relativement facile à transformer génétiquement. De plus, de nombreuses données moléculaires sont disponibles telles que des banques BAC, cartes génétiques et physiques, banques d'ADNc, banques de mutants.

La taille du génome a été évaluée au cours des récents travaux de séquençage à 460 Mbp pour la variété *indica* 93-11 (Yu *et al.,* 2002) et 420 Mpb pour la variété *japonica* Nipponbare (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Cette taille est environ 4 fois plus importante que celle du génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (125 Mb), mais bien plus faible que celles des autres monocotylédones de grande culture. De plus, le séquençage des génomes complets de 21 variétés est en cours par le IRFGC (International Rice Functional Genomics Consortium) en utilisant des puces haute densité (McNally *et al.*, 2006). Cette méthode

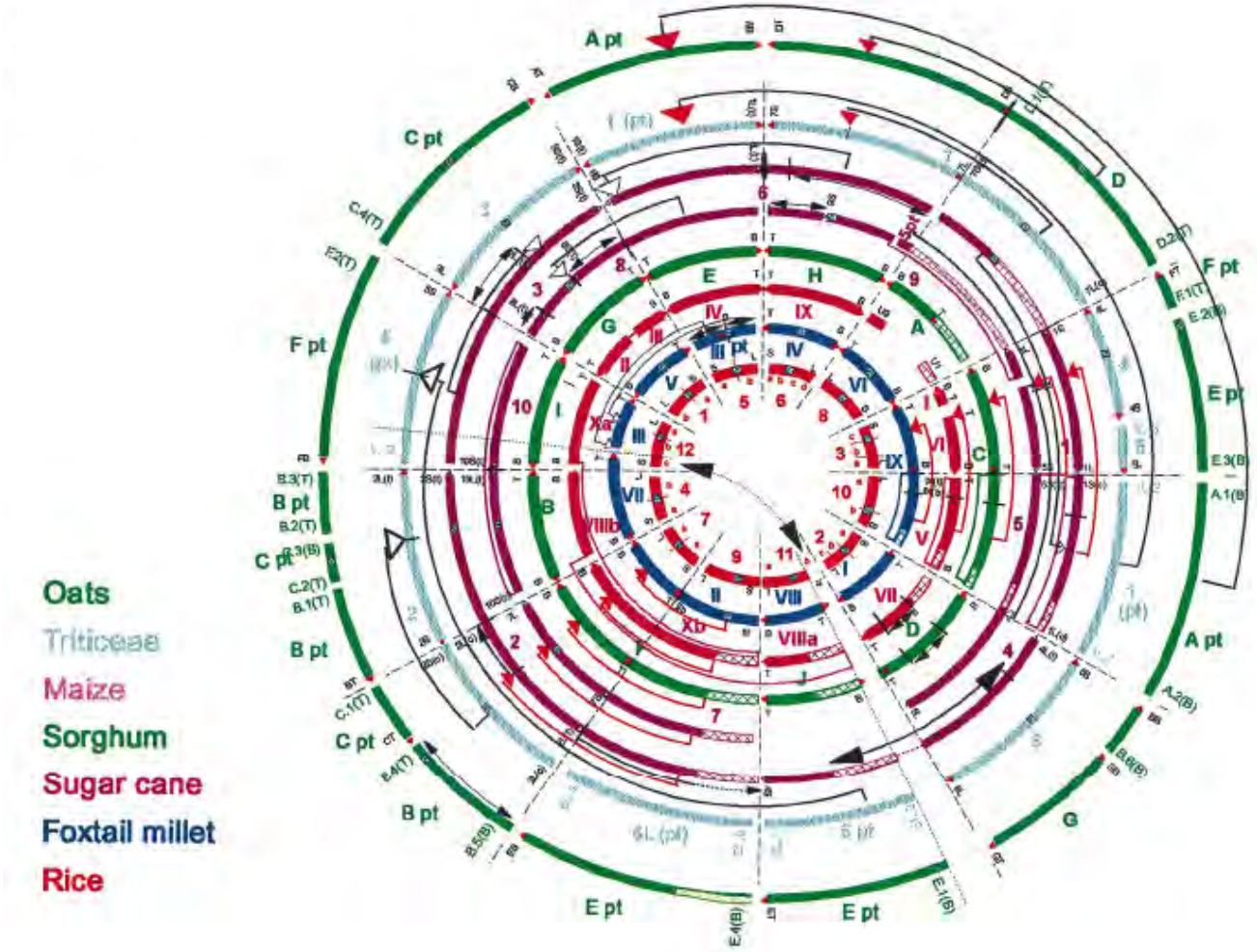


Figure 1.9. Synténie entre les génomes de céréales.

d'après Devos *et al*., 2005

permet la détection de SNP par rapport à un génome de référence. Parmis les 21 variétés, la variété IR64 qui possède un allèle fonctionnel de *Pi33* est disponible.

Les utilisations possibles des données génomiques du riz pour l'étude des autres céréales ont été répertoriées en détail par Xu *et al.* (2005). Malgré des différences importantes de taille de génome (400 Mb pour le riz à 16 000 Mbp pour le blé), le génome du riz est également un outil utile du fait de la synténie entre les différentes céréales (Ahn *et al.* 1993 ; Devos, 2005) (Figure 1.9). Ainsi, l'établissement des cartographies génétiques au sein des autres céréales est facilité par l'utilisation de marqueurs génétiques du riz (Brueggeman *et al.* 2002 ; Bossolini *et al.*, 2006). De plus, la conservation des orthologues est également relativement bonne. Cependant, pour les cartographies fines, la colinéarité entre le riz et les autres céréales peut difficilement être utilisée du fait d'une conservation réduite des structures génomiques localement entre les céréales (Feuillet et Keller 1999 ; Kellogg et Bennetzen 2004). Ainsi 86% des EST du blé ont un orthologue chez le riz mais seulement 56% de ces EST sont colinéaires avec cet orthologue chez le riz (See *et al.*, 2006). D'autre part, l'accès à des collections de mutants de riz et la facilité à transformer le riz peut également simplifier l'étude de certains gènes identifiés chez d'autres céréales (Xu *et al.*, 2005).

Le riz et *M. oryzae* étant à la fois des modèles et respectivement, une plante de grande culture et un agent pathogène majeur, ce couple est considéré comme un modèle pour les interactions plantes/champignons phytopathogènes (Valent *et al.*, 1990 ; Veneault Fourrey et Talbot, 2005). La plupart des autres modèles concernent plutôt les dicotylédones (arabidopsis, tomate) et surtout les bactéries. Or, il est probable que les systèmes de défense ne soient pas exactement les mêmes chez les monocotylédones. Par exemple, un des grands types de gènes de résistance connu chez les dicotylédones (les TIR-NBS-LRR) est absent des monocotylédones.

Parmi toutes les interactions entre gènes de résistance spécifiques du riz et gènes d'avirulence de *M. oryzae*, l'équipe a choisi de s'intéresser à l'interaction *Ace1/Pi33* car le gène d'avirulence est cloné, ce qui ouvre des perspectives d'étude de l'interaction au niveau moléculaire. De plus, cette interaction semble originale.

I.3 L'interaction ACE1/Pi33

I.3.1 Le gène d'avirulence *ACE1*

Le gène d'avirulence *ACE1* (Avirulence Conferring Enzyme 1) a été cartographié sur le chromosome 1 à l'aide d'un croisement entre une souche sauvage avirulente et un mutant virulent (Silue *et al.*, 1992, Dioh *et al.*, 2000), puis cloné (Böhnert *et al.*, 2004). Ce gène code pour une

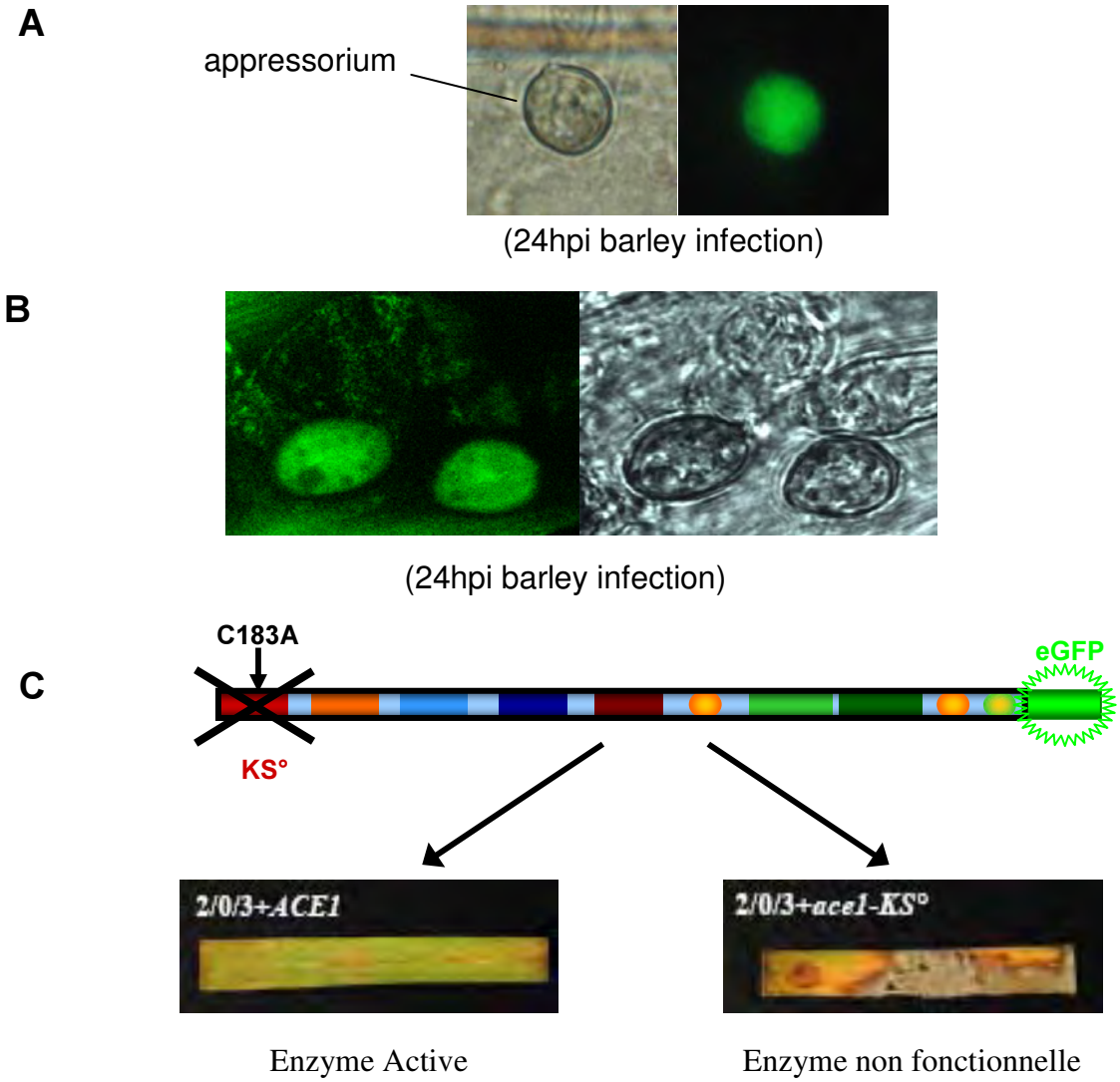


Figure 1.10. Fonction moléculaire de *ACE1*.

d'après Böhnert *et al*. 2004

A Démonstration de l'expression spécifique d'*ACE1* dans l'appressorium par fusion GFP avec le promoteur de *ACE1*

B Démonstration du caractère cytoplasmique d'ACE1 par fusion GFP avec *ACE1*

C Démonstration du rôle de la fonction enzymatique d'ACE1 pour l'avirulence par transformation avec un allèle d'*ACE1* muté dans le domaine enzymatique

enzyme de 4 035 acides aminés de type PKS-NRPS (Polycétide Synthase- Peptide Synthétase Non Ribosomale). Ces enzymes sont impliquées dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Song *et al.*, 2004). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la fonction enzymatique d'Ace1 est essentielle pour la reconnaissance par les cultivars de riz (Figure 1.10). *ACE1* est situé dans un cluster de 15 gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Collemare *et al.*, 2007). Le profil d'expression des différents membres au cours d'une infection indique que tous ces gènes sont induits très tôt de manière similaire à *ACE1* (Collemare *et al.*, 2007) et seraient probablement co-régulés. Plusieurs membres du cluster ont été testés pour vérifier leurs implications dans la formation du métabolite secondaire. Cependant l'étude de mutants n'a pas permis de démontrer le rôle de certains candidats, et notamment celui de la deuxième PKS-NRPS du cluster, dans la formation du métabolite secondaire.

ACE1 est exprimé spécifiquement lors de l'interaction. En effet, des expériences de RT-PCR et de fusion transcriptionnelle entre le promoteur et le terminateur d'*ACE1* et le gène de la GFP ont permis d'établir que *ACE1* n'est transcrit que dans les appressoria durant la pénétration du champignon dans la plante (Böhnert *et al.*, 2004) (Figure 1.10). De plus, la régulation d'*ACE1* est indépendante de signaux provenant de la plante (précurseurs de la paroi cellulaire végétale) et indépendante de voies de signalisation impliquées dans le développement de l'appressorium. Elle serait liée à l'initiation de la pénétration de *M. oryzae* dans les tissus végétaux (Fudal *et al.*, 2007). Bien que ce profil d'expression soit en accord avec un rôle dans l'avirulence, il est unique pour des gènes du métabolisme secondaire. Le fait que l'enzyme ne soit pas sécrétée, implique que la fonction enzymatique est essentielle pour la reconnaissance précoce de la part de la plante, ce qui a été montré (Böhnert *et al.*, 2004).

L'hypothèse la plus simple est donc qu'*ACE1* participerait à la synthèse d'un métabolite qui serait sécrété dans la plante où il serait reconnu directement ou indirectement par le produit du gène de résistance *Pi33* (Figure 1.11).

I.3.2 Cartographie génétique de *Pi33*

Le caractère monogénique et dominant de la résistance correspondant à *ACE1* a été établi (Berruyer *et al.*, 2003). Les descendants de deux croisements IR64 x Azucena (105 lignées haploïdes doublés, HD) et Azucena x Bala (98 lignées obtenues par Single Seed Descent, SSD en F6) ont été utilisés pour la construction de cartes génétiques et ont permis de cartographier *Pi33* à proximité du marqueur G1010 sur le bras court du chromosome 8. Dans cette région du génome du riz, deux autres gènes de résistance à la pyriculariose ont été répertoriés : *Pi29*(t) (Sallaud *et al.*, 2003) présent dans la variété IR64 et *Pi11*(= *Pizh* ; Zhu *et al.*, 1993 ; Causse *et al.*, 1994) présent

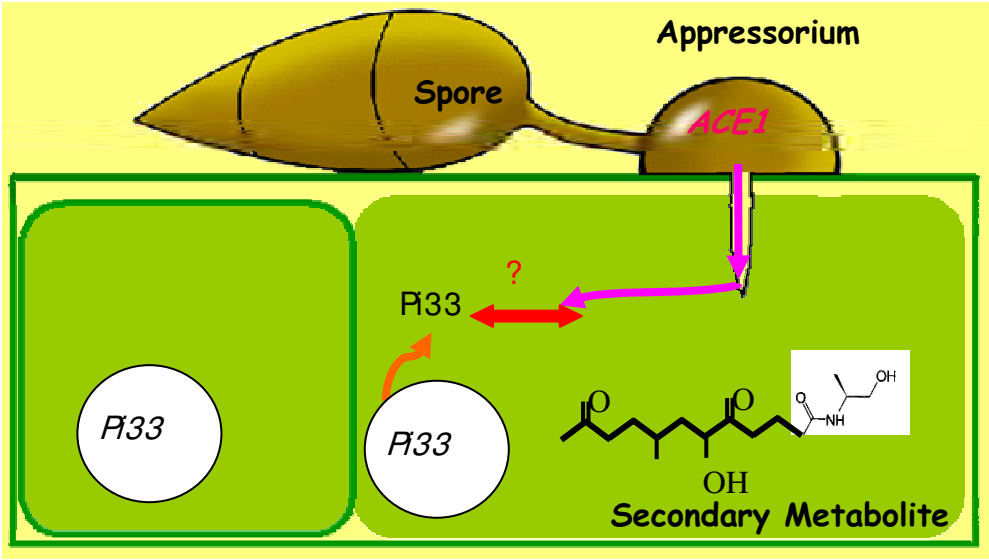


Figure 1.11. Modèle d'interaction entre *Magnaporthe oryzea* (*ACE1*) et le riz (*Pi33*).
La PKS-NRPS ACE1 est impliquée dans la production d'un métabolite secondaire qui serait sécrété dans les tissus végétaux. Ce métabolite interagirait directement ou indirectement avec le produit du gène de résistance *Pi33*.

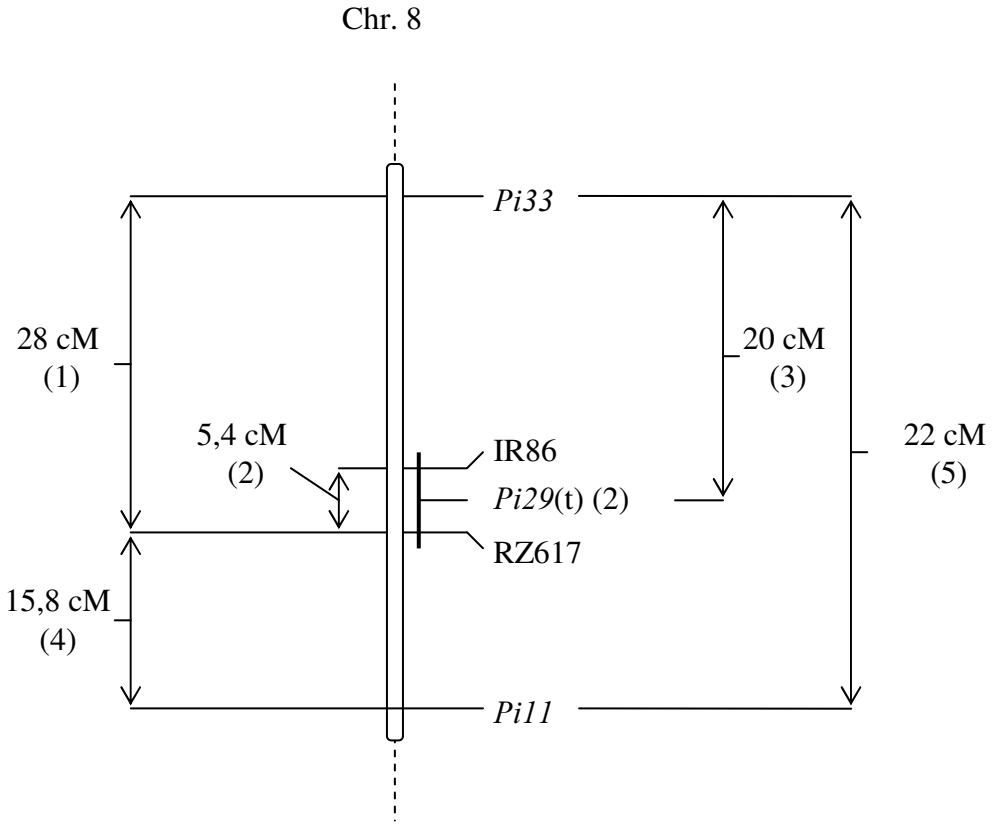


Figure 1.12. Cartographie composite des gènes *Pi-11*(t), *Pi-29*(t), *Pi33*.
d'après R. Berruyer
(1) : Tharreau *et al.*, 2000; (2) : Sallaud *et al.*, 2003; (3) : Berruyer et al., 2003; (4) : Zhu *et al.*, 1993; (5) : Berruyer et al., 2003.

dans la variété ZYQ8. Ces deux variétés possèdent aussi *Pi33* (Berruyer *et al.*, 2003 ; Figure 1.12). Il a été démontré que *Pi33* était un gène de résistance non décrit, d'une part en comparant son spectre de résistance avec celui des principales variétés différentielles connues, et d'autre part grâce à des tests d'allélismes avec en *Pi29*(t) et *Pi11* (Berruyer *et al.*, 2003).

Le gène *Pi33* a d'abord été cartographié sous le nom de *Pi-Irat7-1* sur 105 lignées HD du croisement IR64 × Azucena (Tharreau *et al.*, 2000). Il était cartographié dans une zone de 6,7 cM entre les marqueurs G1010 et G104. Au cours de la thèse de Romain Berruyer une cartographie génétique plus fine a été établie à partir de 500 lignées HD supplémentaires et 286 descendants SSD du croisement IR64 x Azucena produits dans le cadre du projet EGRAM (Berruyer *et al.*, 2003). Ces lignées ont été caractérisées avec différents marqueurs microsatellites, dont deux, RM44 et RM72, encadrent *Pi33*. Sur un total de 889 lignées, 851 furent caractérisées pour les deux marqueurs microsatellites comme présentant l'un ou l'autre des allèles parentaux. Parmi ces dernières, 90 lignées étaient recombinantes entre les deux marqueurs, distants d'une dizaine de cM et choisis pour identifier les recombinants autour de *Pi33*. Parmi ces recombinants, certains présentaient un phénotype douteux et d'autres se sont avérés être des contaminations. Ces descendants ont été retirés de l'analyse et des marqueurs microsatellites supplémentaires ont été utilisés pour affiner la carte. Une nouvelle position génétique a été établie entre deux marqueurs (RMS*Pi33*-53 et RM3507) distants de 0.5 cM, située à 10 cM de la position publiée par Berruyer *et al.* (2003). C'est à partir de cette position qu'a démarré le travail de thèse.

I.3.3 Originalités de l'interaction ACE1/Pi33.

Bien que plusieurs gènes de résistance et d'avirulence aient été clonés, peu de couples gène d'avirulence fongique/gène de résistance sont caractérisés. La majorité de ces couples provient de l'interaction tomate/*Cladosporium fulvum* : *Cf2*/*Avr2*, *Cf4*/*Avr4*, *Cf9*/*Avr9*. En dehors de ce modèle, un seul couple gène de résistance/gène d'avirulence fongique a été caractérisé (*Pita*/*AvrPita*). Le gène *ACE1* ayant été cloné (Böhnert *et al.*, 2003), le clonage de *Pi33* devient plus intéressant que celui d'un autre gène de résistance. De plus, les particularités du gène d'avirulence *ACE1* (présentées ci-dessus) permettent de supposer que l'interaction *ACE1*/*Pi33* est originale. En particulier, *ACE1* n'étant pas sécrétée par *M. oryzae,* cette interaction pourrait suivre un modèle de garde en faisant intervenir un métabolite secondaire. De plus, les premiers résultats semblent indiquer que *Pi33*, à l'instar d'autres gènes de résistance, serait situé au sein d'un cluster de gènes. L'étude de ce cluster chez plusieurs variétés pourrait apporter de nouveaux éléments sur l'évolution des gènes de résistance. En effet, le riz étant structuré en plusieurs espèces à ploïdie variable et ayant subi au moins trois évènements de domestication, l'histoire évolutive de *Pi33* et sa co-évolution avec *ACE1* pourrait présenter un profil original. La question

de l'influence d'évènements récents comme la domestication (10 000 ans) et la révolution verte (50 ans) dans l'évolution du cluster peut notamment être posée. Enfin, *Pi33* est un gène de résistance intéressant pour les sélectionneurs. En effet, en combinaison avec deux autres gènes de résistance, *Pi33* semble conférer un large spectre de résistance aux souches de *M. oryzae* (Martinez *et al.*, 2006).

I.4 Objectifs de la thèse

Le sujet de thèse est centré sur l'objectif de **cartographie physique et de clonage de *Pi33***. Cette cartographie s'accompagne d'une caractérisation du cluster *Pi33* dans différents fonds génétiques. L'étude de la diversité du cluster au niveau moléculaire nécessite au préalable d'identifier les variétés possédant *Pi33*. L'étude de la distribution de *Pi33* dans différentes espèces et sous-espèces de riz permet non seulement d'apporter du nouveau matériel végétal pour le clonage mais encore de répondre à la question de **l'origine de *Pi33***. Enfin, **replacer l'interaction *ACE1/Pi33* dans le contexte des réactions de défense** de la plante pourrait permettre de confirmer l'originalité de cette interaction en la comparant à d'autres types d'interactions. Le sujet de thèse s'organise donc autour de trois objectifs principaux qui formeront les trois chapitres de cette thèse :

(1) Déterminer l'origine de *Pi33*, étudier la structuration du gène dans les deux principales sous-espèces de riz *Oryza sativa japonica* et *Oryza sativa indica* ainsi qu'au sein du genre *Oryza*. Cette étude entraîne plusieurs questions qui s'inscrivent à différents niveaux. Du point de vue de l'amélioration variétale, la question du nombre et de l'origine des sources de *Pi33* utilisées par les sélectionneurs pour obtenir les variétés modernes indica demi-naines se pose. D'un point de vue évolutif, *Pi33* a-t'il une origine ancienne ? Est-il présent à la même fréquence chez toutes les espèces et sous-espèces de riz ? Quelle a été l'influence de la domestication sur son évolution ? Suit-il une co-évolution sous forme de course à l'armement avec *M. oyzae* ?

(2) Caractériser la diversité au niveau du cluster *Pi33* et cloner l'allèle de résistance *Pi33*. Cette caractérisation peut se faire à différents niveaux. La diversité structurale, allèlique et transcriptomique des différents membres du cluster peut permettre non seulement de faciliter le clonage du gène en éliminant certains candidats mais encore d'apporter un éclairage sur le fonctionnement du cluster et son évolution. Existe-t-il des différences de structure au niveau du cluster chez les différents porteurs de résistance ? Quelle est la diversité au sein des allèles de *Pi33* ? Les autres membres du cluster ont ils une fonction ?

(3) Replacer l'interaction *ACE1/ Pi33* dans le contexte des réactions de défense de la plante. L'objectif est d'identifier des gènes marqueurs caractéristiques de cette réaction incompatible et de vérifier l'expression de ces gènes dans d'autres types d'interactions (incompatibles faisant intervenir d'autres gènes de résistance, et compatibles). La question est ici de savoir si les voix de transduction du signal de défense sont communes aux différentes interactions.

II Chapitre 1

Origine de Pi33

Photo : graines de riz sauvages de l'IRRI (Elsa Ballini)

Variétés	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
IR8	O	X												
Cica4			O	X										
IR22			O	X										
Cica6						O	X							
Cica7								O		X				
Cica9								O	X					
Cica8										O		X		
Metica1													O	X

Figure 2.1. Contournement de la résistance dans les variétés modernes d'Amérique latine de 1969 à 1982.

D'après Lopez-Gerena (2006). O = année de mise en circulation de la variété, X = année de contournement de la résistance. Une résistance est considérée comme contournée quand un nombre significatif de symptômes sont observés au champ sur une nouvelle variété considérée jusque là comme résistante.

II.1 Introduction

Durant la révolution verte (2ème moitié du XXème siècle) de nombreuses améliorations variétales ont permis de créer plusieurs variétés de riz à haut potentiel de rendement et très résistantes aux agents pathogènes. Cependant, il s'est avéré que ces résistances n'étaient pas durables car elles ont été rapidement contournées par les agents pathogènes (Figure 2.1 ; Kiyosawa, 1989). Mieux comprendre la co-évolution entre la plante et ses agents pathogènes est donc nécessaire pour espérer prévenir d'autres contournements et surtout maintenir une résistance stable dans l'espace et durable dans le temps. Derrière cette thématique de co-évolution, se présente la question de l'origine des gènes de résistance. Cette question peut se poser de deux manières. D'un point de vue fondamental, la présence d'un gène de résistance chez les espèces ancestrales peut permettre d'étudier son histoire évolutive au regard de différents modèles d'évolution et de co-évolution qui sont proposés. D'un point de vue pratique, les sélectionneurs s'interrogent également sur « l'origine» d'un gène dans les espèces traditionnelles et sauvages afin d'orienter la recherche de nouveaux allèles ou de nouvelles sources de résistance.

II.1.1 Une origine ancienne des gènes de résistance

Plusieurs indices semblent étayer l'hypothèse d'une origine ancienne des gènes de résistance. Tout d'abord des études ont démontré la conservation des grandes familles de gènes de résistance (NBS-LRR et LRR-kinase ; voir Chapitre 2 Paragraphe III-1-1-a) dans de nombreux genres voir même entre les différents règnes (Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000; Vleeshouvers *et al.*, 2001). Ainsi de fortes similitudes entre le domaine Nucleotide Binding des NBS-LRR des plantes et le domaine Nucleotide Oligomerization des protéines NLR (Nod Like Receptor) des animaux (Albrecht *et al.*, 2003) existent, même si ces similitudes ne sont peut-être qu'un phénomène de convergence évolutive (Ausubel *et al.*, 2005). Quoi qu'il en soit, la famille des gènes NBS-LRR est présente à la fois chez les gymnospermes et les angiospermes (Liu *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2007). Cela démontrerait que le système de reconnaissance des agents pathogènes par les plantes a été mis en place très tôt (plus de 300 millions d'années). Un autre argument en faveur d'une origine ancienne (quelques millions d'années) des gènes de résistance est la présence de résistances dans les espèces sauvages qui ont d'ailleurs été utilisées comme sources de nouvelles résistances chez les plantes cultivées (Simmonds, 1993 ; Holland, 2004).

L'hypothèse alternative est que les gènes de résistance ont une origine plus récente (une dizaine de milliers d'années). En effet, il est possible que la domestication ait également eu un impact sur l'évolution des gènes de résistance dans les plantes cultivées. Au moment du processus de domestication, une pression de sélection très forte a été exercée sur la résistance car seules les plantes qui survivaient aux stress environnementaux pouvaient être récoltées. D'une manière

générale, avec le choix des meilleurs phénotypes, le processus de domestication a provoqué une réduction de la diversité par dérive (goulot d'étranglement). Ensuite, la culture à grande échelle a favorisé l'émergence de souches d'agents pathogènes plus agressives. Enfin, un gène ancien a pu également acquérir de nouvelles spécificités plus récemment, du fait des pressions de sélections exercées, soit de manière naturelle par les agents pathogènes, soit de manière artificielle par l'agriculture. La question de « l'âge » des gènes de résistance et de leur spécificité reste donc posée. Sont-ils très anciens, de l'ordre du million d'années, ou plus récents, de l'ordre de la dizaine de milliers d'années ?

L'examen de la littérature montre que la question de l'origine des gènes de résistance a été finalement assez peu traitée. Les études se limitent à quelques pathosystèmes pour lesquels les gènes de résistance et d'avirulence ont déjà été clonés. La démonstration de l'origine d'un gène de résistance a été abordée par différentes méthodes (distribution du gène dans les populations de plantes cultivées et sauvage, complémentation d'allèle d'origine sauvage, et polymorphisme allélique) qui se basent essentiellement sur deux principales théories de co-évolution entre la plante et son agent pathogène. La première théorie appelée « course à l'armement », sous entend une lutte permanente entre la plante et l'agent pathogène concernant, l'acquisition de nouvelles résistances pour l'un, ou l'acquisition de nouvelles virulences pour l'autre. La deuxième théorie appelée « guerre des tranchées » sous-entend une lutte plus étalée dans le temps qui passe par le maintien d'une situation en équilibre. Ces deux théories de co-évolution pourraient trouver une explication au niveau moléculaire car elles pourraient être le reflet du type d'interaction moléculaire entre les protéines de résistance et les protéines d'avirulence (interaction directe ou indirecte) (Van der Hoorn *et al.*, 2002). Nous allons voir quels sont les attendus de chaque théorie qui permettent de définir sous quel type de co-évolution est maintenu une interaction gène-pour-gène.

a <u>La course à l'armement</u>

Lors d'une **interaction directe**, la protéine de résistance reconnaît directement la protéine d'avirulence. La moindre mutation de la protéine d'avirulence peut réduire, voir supprimer, la reconnaissance par le produit du gène de résistance. Dans ce cas, ce n'est pas la fonction de la protéine d'avirulence qui subit une pression de sélection mais sa conformation. Dans cette situation, une **sélection directionnelle** s'exerce vers l'acquisition de nouvelles spécificités. Le gène de résistance et le gène d'avirulence vont alors accumuler des mutations qui n'imposeront pas forcément un coût évolutif si le changement de conformation n'entraîne pas de changement de fonction de la protéine. Cette co-évolution est décrite comme une « course à l'armement » qui sous-entend une évolution rapide. Dans ce cas le gène de résistance peut être

ancien ou récent mais les allèles actuels sont par définition récents. Cependant, peu d'études tendent à démontrer ce phénomène de «course à l'armement» contre les agents pathogènes (*L5*, *L6* et *L7* chez le lin, Dodds *et al.*, 2006 ; *Pm3* chez le blé, Yahiaoui *et al.*, 2004).

Ce type de co-évolution a des conséquences en terme de fréquence et de polymorphisme allélique. Dans le cadre d'une course à l'armement, un fort turn-over au niveau des allèles se traduit par la présence dans la population d'un **allèle majoritaire présent à une fréquence élevée** (Figure 2.2). L'origine récente de cet allèle est attestée si cet allèle est absent des espèces proches ou présent mais à une fréquence faible. La signature moléculaire de ce type de co-évolution sera liée à une **sélection positive**. La fréquence des mutations non synonymes par rapport aux mutations synonymes (Ka/Ks) est un facteur qui permet de mettre en évidence ce type de sélection. Une fréquence supérieure à un serait le signe d'une pression de sélection positive alors qu'une fréquence inférieure à un serait le signe d'une pression de sélection négative. Les rapports Ka/Ks ont été ainsi évalués pour plusieurs gènes et il s'avère que le rapport peut être particulièrement élevé dans les domaines des protéines qui subissent la pression de sélection. Ainsi le domaine LRR (Leucine Rich Repeat) est le siège de nombreuses mutations non synonyme particulièrement au niveau des résidus exposés (Jiang et al., 2007). Les gènes RPP13, L, P et RPP8 présentent des rapports Ka/Ks élevés dans leur domaine LRR (Tableau 2.1).

b La guerre des tranchées

Dans le cadre de **l'hypothèse de garde**, la protéine de résistance détecte des modifications d'une protéine ciblée par la protéine d'avirulence de l'agent pathogène. La protéine d'avirulence devant conserver son affinité pour la protéine cible de la plante, les mutations qui pourront être sélectionnées sont plus limitées. En effet, les mutations risquent d'engendrer plus facilement une perte de fonction plutôt que l'acquisition d'une nouvelle résistance. Une manière de contourner la résistance pour la protéine d'avirulence de l'agent pathogène est alors d'acquérir une nouvelle fonction (phosphorylation, clivage protéique). Du côté de la plante, la sélection s'exerce alors sur la détection de cette nouvelle fonction. Ce type de co-évolution est plus stable et implique une **sélection balancée** qui peut être **fréquence dépendante** (Stahl *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2002 ; Rose *et al.*, 2007). De plus, l'acquisition d'une nouvelle fonction peut engendrer un **coût de fitness** supplémentaire pour la plante (Tian *et al.*, 2002).

Ce type de co-évolution a également des conséquences en terme de fréquence et de polymorphisme allélique. Une sélection balancée va permettre le maintien dans la population de **plusieurs allèles à des fréquences variables** (Figure 2.2). En effet, cette fréquence va varier en fonction de la fréquence du gène d'avirulence présent dans la population de l'agent pathogène. Le gène révèle alors une origine ancienne qui peut être démontrée par la présence de l'allèle chez des

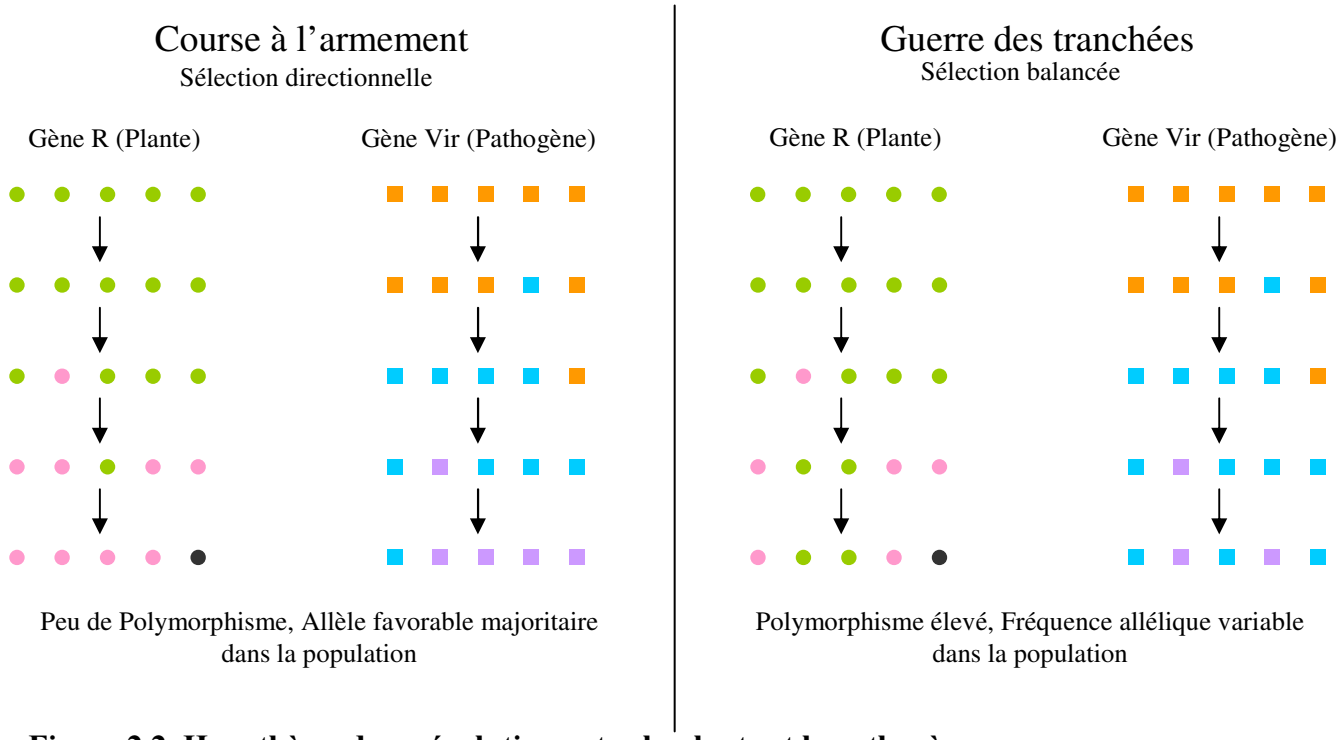


Figure 2.2. Hypothèses de co-évolution entre la plante et le pathogène.

Dans le cadre d'une course à l'armement de nouveaux allèles de résistance (chez la plante) ou de virulence (chez le pathogène) apparaissent et envahissent rapidement la population jusqu'à ce qu'il soient contournés. Dans le cas d'une sélection balancée en guerre des tranchées la fréquence de nouveaux allèles est régulée par un coût à la résistance (ou à la virulence) ou par la fréquence de l'allèle correspondant chez le pathogène (ou chez la plante).

Locus	Gène entier		Région non LRR		Domaine LRR		Résidus exposés		Région C-terminale	
	π	Ka/Ks	π	Ka/Ks	π	Ka/Ks	π	Ka/Ks	π	Ka/Ks
Cf-4/9	0.05	0.65	0.06	0.62	0.06	0.66	0.12	1.51	0.05	0.4
Cf-5	0.08	0.45	0.06	0.69	0.08	0.43	0.1	1.1	0.07	0.35
Sw-5	0.14	0.61	0.12	0.58	0.15	0.89	0.2	0.84	0.2	1.24
L	0.03	1.01	0.02	0.77	0.05	1.53	0.12	3.28	0.04	1.16
N-A/B	0.07	0.48	0.06	0.33	0.08	0.73	0.13	1.77	0.09	0.64
N-C/D	0.06	0.58	0.05	0.4	0.08	0.75	0.16	1.73	0.06	0.57
P	0.04	0.81	0.04	0.55	0.06	1.2	0.12	2.76	0.04	0.55
RPP13	0.05	0.91	0.02	0.44	0.1	1.55	0.11	2.52	0.11	2.29
RPP8	0.04	0.78	0.03	0.52	0.07	1.2	0.14	1.49	0.05	0.76
Pi2/9	0.05	0.74	0.01	0.22	0.04	0.93	0.08	2.41	0.05	1.15
Rp1	0.07	0.51	0.06	0.54	0.09	1.06	0.12	1.35	0.06	0.48
Rp3	0.03	0.53	0.02	0.6	0.05	0.47	0.08	1.96	0.05	0.54
Moyenne	0.06	0.67	0.05	0.52	0.07	0.95	0.12	1.89	0.07	0.84

Tableau 2.1. Diversité nucléotidique et Ka/Ks de quelques gènes de résistance.

Adapté de Jiang *et al.*, 2007. π représente la diversité nucléotidique moyenne pour toutes les comparaisons. Ka/Ks est une moyenne pour toutes les comparaisons.

espèces proches à une fréquence variable. La signature moléculaire de ce type de co-évolution sera liée à une **sélection négative**. Le calcul du rapport Ka/Ks sera inférieur à un car le nombre de mutations non synonymes est limité par le fait que le gène ne peut pas perdre sa fonction. Dans le cas extrême, l'allèle sensible peut être totalement absent de la population. C'est le cas notamment du gène *RPM1* chez Arabidopsis (Grant *et al.*, 1998).

c Limites des interprétations d'analyse moléculaires et hypothèses alternatives de co-évolution

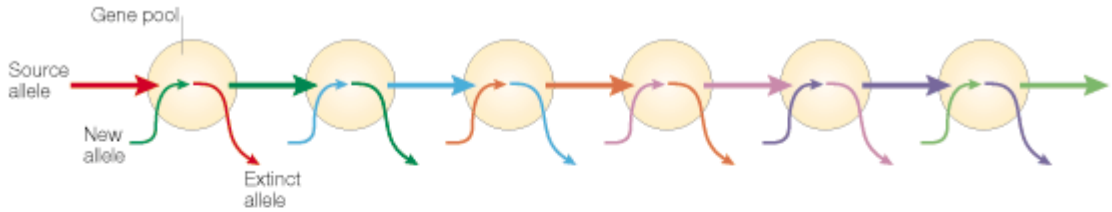
Bien que de multiples tests permettent de détecter la signature moléculaire des ces deux types de co-évolutions (Hudson *et al.* 1987; Tajima 1989; McDonald and Kreitman 1991), il semble difficile de toujours les distinguer des autres pressions de sélection exercées sur la plante et son agent pathogène. En effet, il faut tenir compte du mode de reproduction de l'hôte, des pressions de sélection dues à l'environnement et aux interactions avec d'autres agents pathogènes (de Meaux and Mitchell-Olds 2003; Tiffin and Moeller 2006). De plus, en population naturelle, la structuration géographique de la plante hôte et de son agent pathogène peut jouer un rôle non négligeable (Thompson, 1999; Gomulkiewicz *et al.*, 2000). Holub (2001) propose un modèle de polymorphisme recyclé évolutif (Figure 2.3) où de nouvelles résistances apparaîtraient et seraient réutilisées en fonction de la pression de sélection exercée par l'agent pathogène. Ce modèle fait en quelque sorte la synthèse entre les deux modèles précédents. Il n'est donc pas toujours aisé de déterminer quel type d'évolution suit un gène de résistance. Une étude relativement exhaustive chez *A. thaliana*, portant sur le polymorphismes des motifs LRR de 27 gènes de résistance chez 96 individus indique que tous les cas de pressions de sélection sont envisageables (Bakker *et al.*, 2006). La relation entre les interprétations moléculaires de la théorie gène-pour-gène et les différents modèles évolutifs est probablement simpliste et l'histoire évolutive de chaque couple plante/agent pathogène est probablement plus complexe.

Enfin, les modèles ne s'appliquent pas aux populations cultivées. En population cultivée, un gène de résistance inopérant peut être maintenu artificiellement par la culture de variétés possédant ce gène. De plus, une signature moléculaire, trace d'une co-évolution ancienne entre la plante sauvage et un agent pathogène, a pu être modifiée suite à un passage par des goulots d'étranglement récents (par exemple chez le riz 10 000 ans : domestication et 50 ans : révolution verte…).

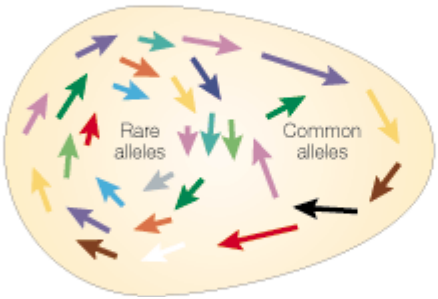
d Distribution des gènes de résistance chez les espèces domestiquées et leur ancêtres sauvages, quelques exemples

Peu d'études de distribution des gènes de résistance sont disponibles dans les variétés cultivées, et encore moins dans les espèces sauvages. Plusieurs analyses assez complètes ont été

Modèle de polymorphisme passagé (sans recyclage, système ouvert)



Modèle de polymorphisme recyclé (système fermé)



Modèle de polymorphisme recyclé évolutif (système fermé)

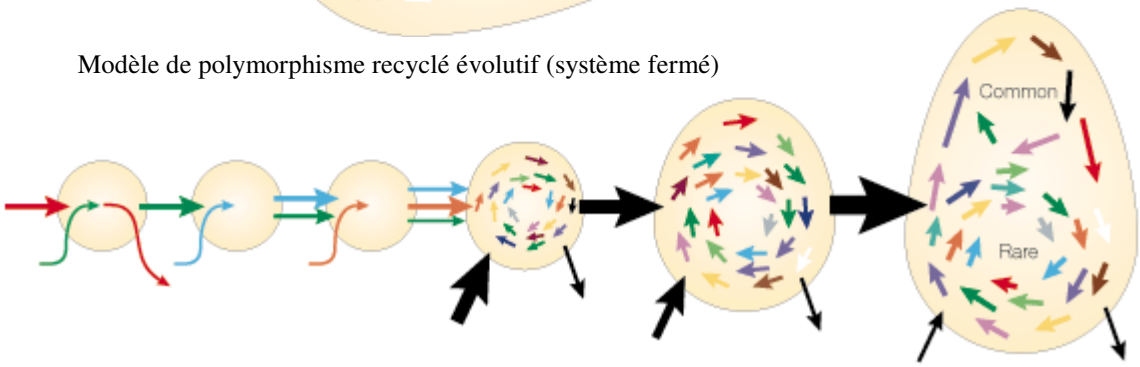


Figure 2.3. Évolution des gènes de résistance, les trois modèles d'évolution en population. (D'après Holub, 2001) Le modèle 'polymorphisme passagé', les allèles R disparaissent dans les populations locales suite à l'émergence de nouvelles virulences, mais ils sont remplacés par de nouveaux allèles. Le modèle 'polymorphisme recyclé' dans lequel plusieurs allèles sont maintenus et réutilisés en fonction de la virulence du pathogène et du coût de la résistance sans extinction ou création de nouveaux allèles. Le modèle 'polymorphisme recyclé évolutif' fait la synthèse des deux précédents modèles

faites chez la tomate et son ancêtre sauvage *Lycopersicon pimpinellifolium* (Riely *et al.*, 2001; Van der Hoorn *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2002; Kruijt *et al.*, 2004). Ainsi, le gène *Pto* aurait une origine ancienne (Riely *et al.*, 2001) qui pré daterait la séparation entre les espèces sauvages *L. hirsutum* et *L. pimpinellifolium* et aurait disparu chez certaines espèces (*L. esculentum*). De même, l'origine ancienne de *Cf9* a pu être démontrée (Van der Hoorn *et al.*, 2001). Dans ces deux cas l'allèle présent chez l'espèce sauvage a été cloné et sa fonctionnalité a été mise en évidence par complémentation dans une variété sensible. Dans le cas de *Pto*, la fréquence de la reconnaissance du gène d'avirulence *AvrPto* a également été estimée chez les différentes espèces sauvages par des inoculations avec des souches de *Pseudomonas syringae* isogéniques pour *AvrPto* et par le séquençage des homologues de *Pto* (Rose *et al.*, 2005). La fréquence de *Pto* est ainsi évaluée à 53% sur un échantillon de 30 variétés représentant cinq espèces de tomates. De même, dans le cas de *Cf9*, la fréquence des deux allèles conférant la résistance a été évaluée dans des populations de l'espèce sauvage *L. pimpinellifolium.* Cette fréquence serait variable selon l'origine géographique et s'échelonnerait entre 12% et 47% (Van der Hoorn *et al.*, 2001). Ces résultats sont comparables à ceux établis chez *Arabidopsis thaliana* pour *Rpm1* (52%, Stahl *et al.*, 1999) et *Rpp13* (75%, Beynon *et al.*, 2007). Par contre, le gène de résistance à *B. lactucae Dm3* n'est présent que dans une accession sur 1033 de laitues sauvages *Lactuca serriola.* Ce résultat laisse penser que ce gène a été introgressé relativement récemment chez l'espèce cultivée ou que l'accession sauvage à l'origine de la laitue cultivée possédait le gène (Kuang *et al.*, 2006).

Enfin, quelques études ont établi la distribution de gènes de résistance au sein d'espèces cultivées. La distribution des gènes de résistance *Pm10*, *Pm11*, *Pm14* et *Pm15* a été étudiée chez 366 accessions de blé *T. aestivum* (Tosa *et al.*, 1995). La fréquence de ces gènes est très variable : 68% en moyenne pour *Pm15*, 62% pour *Pm10*, 22% pour *Pm11* et 8% pour *Pm14*. Les gènes *Pm10* et *Pm15* se retrouvent dans la plupart des blés cultivés partout dans le monde. Le gène *Mla-8* serait présent à 63% parmi 63 accessions européennes d'orge (Jørgensen et Jensen, 1983). Le gène *Pita* de résistance à *M. oryzae* serait présent à 14% dans un échantillon de 139 variétés cultivées, essentiellement Nord Américaines (Wang et al., 2007).

Tous ces résultats montrent que les fréquences des gènes de résistance sont très variables. Il semble difficile d'en tirer une règle générale. L'exemple des gènes *Pm* chez le blé met en évidence que la domestication et surtout la diffusion des lignées jouent un rôle capital dans la distribution des gènes de résistance pour une espèce cultivée. De plus, ces exemples auraient tendance à attester l'hypothèse d'une origine ancienne des gènes de résistance puisqu'ils sont, souvent, déjà présents en fréquence relativement élevée dans les variétés sauvages.

Finalement, relativement peu d'études ont été effectuées sur l'origine des gènes de résistance. Ce qui peut limiter le nombre d'étude sur le sujet, est l'accès à des échantillons suffisants et appropriés d'accessions sauvages et cultivées, ainsi que la possibilité d'effectuer des tests de manière fiable. Le genre *Oryza,* comportant une vingtaine d'espèces dont 2 cultivées, fait depuis longtemps l'objet de programmes de conservation (Nakagahra *et al.*, 1997). Plusieurs collections d'accessions sont d'ailleurs disponibles sous forme de graines, ce qui en fait un matériel pratique à utiliser pour ce genre d'étude. De plus, la phylogénie du genre et les structurations des espèces cultivées mais aussi d'une des espèces sauvage sont également connues.

II.1.2 Structuration du genre *Oryza*

Le riz est un modèle intéressant pour étudier l'évolution d'un gène de résistance, car il a subi plusieurs évènements de domestications qui ont participé à la structuration de l'espèce en plusieurs sous-espèces. Plus récemment, la révolution verte a beaucoup modifié la diversité des riz cultivés. Le genre *Oryza* est composé de plus de 20 espèces diploïdes ou polyploïdes (Lu *et al.*, 1999) entre lesquelles des flux de gènes interviennent (Ge *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2003; Nishikawa *et al.*, 2005) (Figure 2.4). Le genre se compose d'espèces diploïdes de génome AA dont font partie les riz cultivés, *Oryza sativa* et *O. glaberrima*, et leurs ancêtres sauvages *O. rufipogon* et *O. barthii*, et d'espèces plus éloignées à ploïdie variable présentant les génomes BB, CC, BBCC, CCDD, EE, FF, GG, HHJJ.

Le riz a subi trois épisodes indépendants de domestication à partir de deux espèces sauvages : une espèce asiatique *O. rufipogon* et une espèce africaine *O. barthii*. Des données basées sur des séquences chloroplastiques, génomiques et l'insertion du transposon MITE (Cheng et al., 2003 ; Zhu et Ge, 2005 ; Londo et al., 2006) étayent l'hypothèse que deux domestications indépendantes auraient eu lieu à partir de deux populations différentes d'*O. rufipogon* et auraient donné les deux principales sous-espèces d' *O. sativa* : *indica* et *japonica*. D'après des données moléculaires récentes, la séparation des ancêtres des trois formes principales de riz cultivés (*glaberrima, sativa indica* et *sativa japonica*) pourrait dater de 1 MA (Bennetzen, 2000), c'est-à-dire bien avant la domestication (10 000 ans). Plus récemment, les échanges entre les peuples ont impliqué des hybridations et la création de variétés locales. Ces hybridations à répétition entre les deux sous-espèces asiatiques sont sans doute à l'origine de la très grande diversité du riz asiatique qui peut être répartie en cinq grands groupes : *indica, aus, aromatiques, japonica temperés* et *japonica tropicaux* (Figure 2.5) (Garris *et al.*, 2005).

A l'instar d'autres plantes cultivées, les espèces sauvages de riz ont largement été utilisées en amélioration variétale notamment, pour acquérir de nouvelles résistances aux maladies. Brar et Khush (1997) listent plus d'une vingtaine d'accessions sauvages qui ont ainsi été utilisées dans des

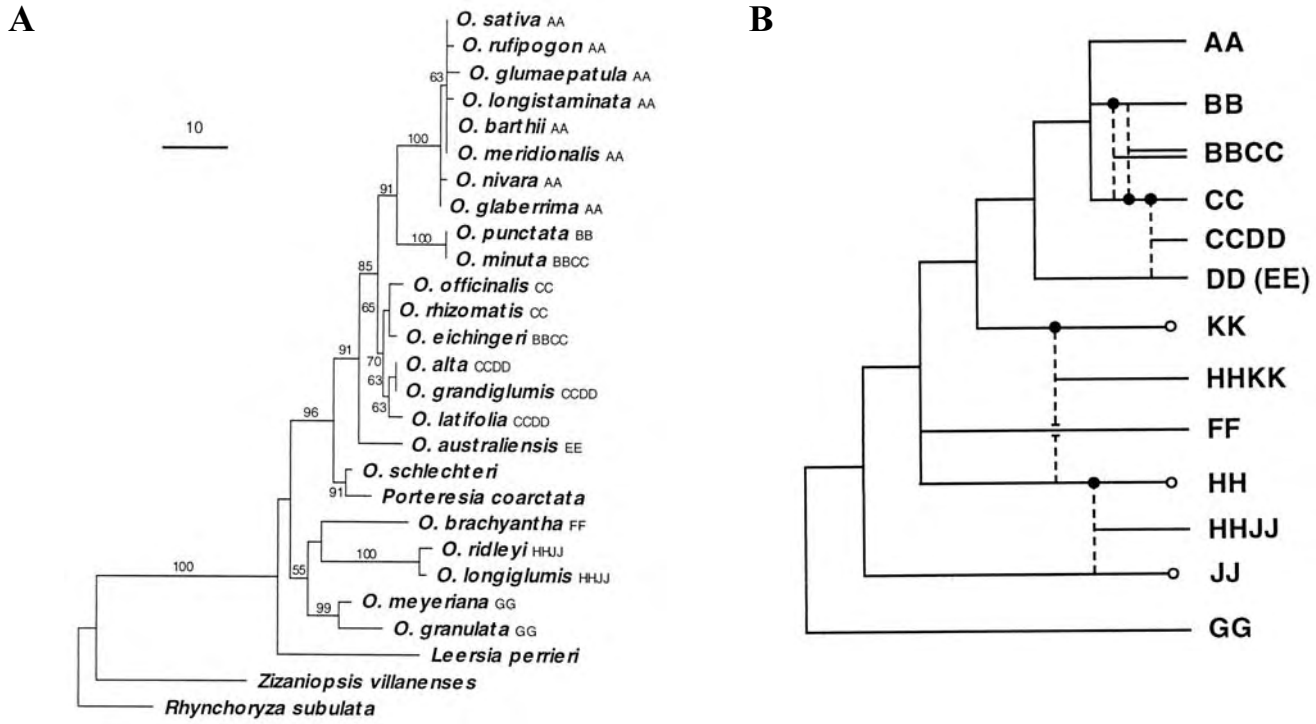


Figure 2.4. Structure des Oryzae et flux de gènes entre génomes.

D'après Ge *et al.*, 1999. A = Arbre construit par maximum de parcimonie à partir de séquences du gène *mat*K. L'échelle représente le nombre de substitutions par site. B = Arbre consensus construit à partir des gènes *Adh1*, *Adh2* et *mat*K Les pointillés indiquent les flux de gènes à l'origine des allotétraploidisations.

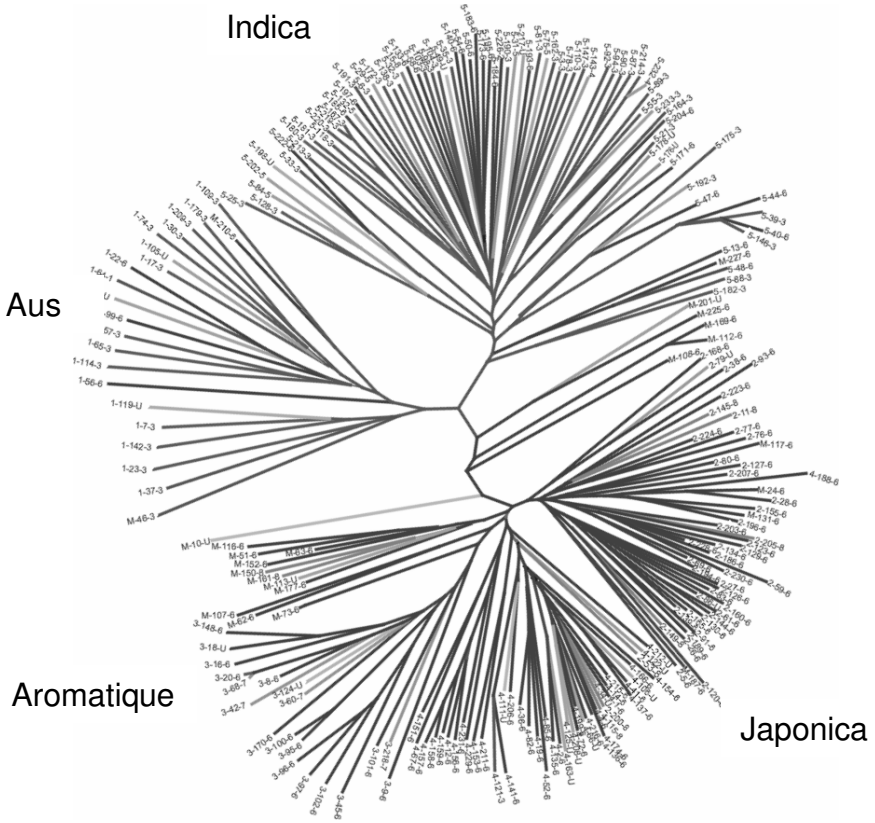


Figure 2.5. Structure des *Oryza sativa*.

(d'après Garris et al., 2005) Une core-collection de 234 individus a été génotypée à partir de 169 marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble du génome. Cette analyse met en évidence les cinq principales sous-espèces de *O. sativa.*

croisements pour introduire de nouvelles résistances et créer les variétés modernes de riz cultivés. Parmi les gènes clonés, on peut citer le gène de résistance à la pyriculariose *Pi9* (Qu *et al.*, 2006) qui provient de l'espèce sauvage *Oryza minuta* et le gène de résistance à *X. oryzae Xa21* qui provient de l'espèce *O. longistaminata*.

II.1.3 Résultats préliminaires

Dans un premier temps, l'objectif de l'équipe était de retrouver les sources de résistances utilisées pour introgresser *Pi33* dans les variétés modernes. Une première série de résultats a ainsi été obtenue au cours de la thèse de Romain Berruyer (2003). Des tests de résistance effectués avec des souches isogéniques de *M. oryzae*, possédant ou non *ACE1*, ont permis d'identifier des lignées possédant un allèle de résistance *Pi33*. Les résultats de phénotypage ont ensuite été confirmés par génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites et RFLP situés au locus *Pi33*. Le gène avait été mis en évidence principalement dans des variétés modernes de riz cultivé (indica demi-naines) et une accession de riz sauvage *O. rufipogon*. Trois haplotypes différents de résistance avaient ainsi été identifiés (Numéroté R1 à R3 sur la Figure 2.6).

L'information sur la généalogie de beaucoup de variétés de riz cultivés étant disponible dans une base de données (International Rice Information System ; http://www.iris.irri.org/), Romain Berruyer avait identifié les variétés initiales et testé leur résistance pour mettre en évidence les variétés parentales possédant *Pi33*. Les généalogies de sept lignées possédant *Pi33* ont ainsi été reconstruites. Pour la variété ZYQ8 la reconstruction de la généalogie n'étant que partielle, le parent source de la résistance n'a pu être identifié. Il s'agit probablement d'une variété traditionnelle qui n'a pas été testée. Pour la variété C101LAC, aucun des deux parents, CO39 et LAC23, n'est résistant. Un génotypage par microsatellite du locus a permis de montrer que LAC23, la source de résistance supposée, n'est pas le parent de C101LAC (Berruyer *et al.*, 2003). La variété à la source de la résistance n'a donc pas pu être identifiée. Pour les cinq dernières variétés (IR64, IR1529, Bala, Irat7 et TN1) les généalogies ont pu être reconstruites dans leurs majeures parties. La variété traditionnelle TYC a été utilisée dans chacune de ces généalogies et semble vraisemblablement être la source de la résistance pour les variétés IR1529, Bala, Irat7 et TN1. D'après ces premiers résultats, l'hypothèse formulée penchait vers l'utilisation d'une unique source de résistance : la variété traditionnelle TYC. Cette variété possédant *Pi33* a servi à la création de la variété TN1, elle aussi résistante. Or, la variété TN1 a été largement utilisée au cours de la révolution verte (deuxième moitié du XXème) pour introduire le semi-nanisme dans les variétés modernes. Ainsi, en introduisant dans les variétés modernes le gène de semi-nanisme sd1 (situé sur le chromosome 1), *Pi33* aurait été lui aussi introgressé par hasard puis sélectionné

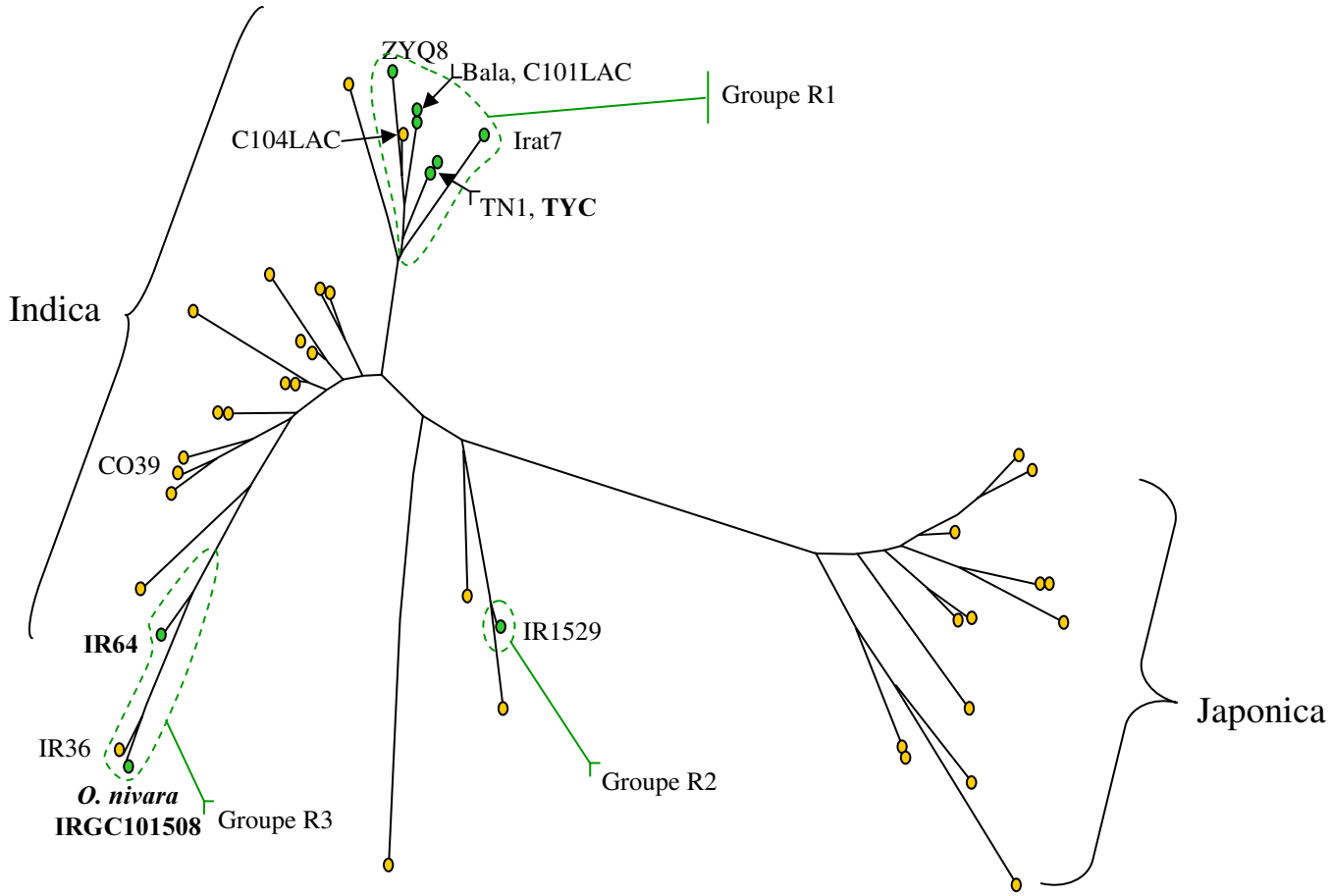


Figure 2.6. Diversité moléculaire au niveau de la zone de *Pi33*, données de Romain Berruyer (2003).

Les variétés ont été génotypées à partir de marqueurs microsatellites et RFLP situés au niveau du cluster *Pi33*. Les résultats de tests de résistance sont représentés par un code couleur. Arbre construit par Neighbor Joining, à partir des valeurs de dissimilarité calculées par l'indice « Simple Maching ».
En vert = variétés résistantes vis-à-vis de *ACE1*, en jaune = variétés sensibles.

indépendamment dans différentes zones géographiques. Cependant, d'autres sources de résistance que TYC ont été utilisées dans la généalogie de la variété IR64.

Le génotypage via des marqueurs microsatellites et RFLP situés au locus *Pi33* a permis de mettre en évidence trois haplotypes de résistance (Figure 2.6). Bala, Irat7, TN1 et TYC ont le même haplotype. IR1529 correspond à un autre haplotype, intermédiaire. IR64 et *O. rufipogon* IRGC101508 partagent le dernier haplotype. L'existence d'au moins deux sources de résistances semblait donc plus probable et l'hypothèse d'une origine plus ancienne de *Pi33* devait être testée en confirmant sa présence dans d'autres accessions de riz sauvages. Cette hypothèse n'excluant pas l'amplification de *Pi33* dans les variétés modernes lors de l'introgression du semi nanisme, nous souhaitions également valider l'hypothèse d'une introgression récente de *Pi33* dans les variétés modernes en étudiant sa distribution dans les différentes sous-espèces de riz cultivés.

II.1.4 Objectifs

Notre objectif était de déterminer l'origine de *Pi33* et d'étudier la structuration du gène dans les deux principales sous-espèces de riz *Oryza sativa japonica* et *Oryza sativa indica*. *Pi33* n'ayant pas été cloné, il n'était pas possible d'utiliser la diversité allélique du gène lui même pour caractériser son évolution. Cependant, l'analyse de sa distribution au sein du genre *Oryza* et le génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites du locus chez différentes variétés permettent de faire des hypothèses sur son évolution. Par cette approche, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes. *Pi33* a-t-il une origine ancienne ? Est il présent à la même fréquence chez toutes les sous-espèces de riz ? Quelle a été l'influence de la domestication sur son évolution ? Quelle a été ou quelles ont étés les sources de résistance utilisées par les sélectionneurs pour obtenir les variétés modernes indica demi-naines ?

Dans un premier temps, les différents haplotypes de résistance *Pi33* ont été confirmés par l'utilisation de marqueurs microsatellites. En effet, les marqueurs utilisés par Romain Berruyer n'étaient pas situés exactement au locus de *Pi33* mais à 10 cM et ce résultat nécessitait d'être confirmé à l'aide d'un plus grand nombre de marqueurs. Dans un deuxième temps, la présence de *Pi33* a été déterminée dans un échantillon représentatif de la diversité des *O. sativa* par des évaluations de leur résistance à des souches de *M. oryzae* isogéniques pour *ACE1*. Par ailleurs, l'introgression de *Pi33* à partir d'une espèce sauvage (*O. rufipogon*) a été caractérisé chez la variété IR64. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Ballini *et al.*, 2007). L'origine sauvage de *Pi33* étant attestée par ces premiers résultats, la présence de *Pi33* a été déterminée par des tests pathologiques dans un second échantillon comportant des espèces sauvages. Ainsi, la présence de *Pi33* ou tout du moins d'un allèle interagissant avec le gène d'avirulence *ACE1*, a été mise en évidence dans différentes espèces sauvages dont certaines relativement éloignées du riz cultivé.

Les hypothèses sur l'évolution de la résistance à *Pi33*, et notamment sur son absence dans certaines espèces, sont discutées.

II.2 Article 2: Modern elite rice varieties of the 'Green Revolution' have retained a large introgression from wild rice around the Pi33 rice blast resistance locus.

New Phytologist

Research

Modern elite rice varieties of the 'Green Revolution' have retained a large introgression from wild rice around the *Pi33* rice blast resistance locus

Elsa Ballini[1]*, Romain Berruyer[1]*, Jean-Benoît Morel[1], Marc-Henri Lebrun[2], Jean-Loup Nottéghem[1] and Didier Tharreau[1]

[1]UMR BGPI, AGRO.M-CIRAD-INRA, Montpellier, France; [2]UMR 2847 CNRS-Bayer CropScience, Physiologie des plantes et des champignons lors de l'infection, Lyon, France

Author for correspondence:
Didier Tharreau
Tel: +33 (0)4 99624839
Fax: +33 (0)499624848
Email: tharreau@cirad.fr

Received: *5 January 2007*
Accepted: *31 March 2007*

Summary

- During the breeding process of cultivated crops, resistance genes to pests and diseases are commonly introgressed from wild species. The size of these introgressions is predicted by theoretical models but has rarely been measured in cultivated varieties.
- By combining resistance tests with isogenic strains, genotyping and sequencing of different rice accessions, it was shown that, in the elite rice variety IR64, the resistance conferring allele of the rice blast resistance gene *Pi33* was introgressed from the wild rice *Oryza rufipogon* (accession IRGC101508).
- Further characterization of this introgression revealed a large introgression at this locus in IR64 and the related variety IR36. The introgressed fragment represents approximately half of the short arm of rice chromosome 8.
- This is the first report of a large introgression in a cultivated variety of rice. Such a large introgression is likely to have been maintained during backcrossing only if a selection pressure was exerted on this genomic region. The possible traits that were selected are discussed.

Key words: introgression, IR64, *Magnaporthe grisea* (rice blast), *Oryza sativa* (rice), *Oryza rufipogon*, wild rice.

New Phytologist (2007) **doi**: 10.1111/j.1469-8137.2007.02105.x

© The Authors (2007). Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

Introduction

Rice (*Oryza sativa*) is the staple food of half of the world's inhabitants (Khush, 2005). Domesticated 10 000 yr ago (Oka & Wang, 1962), rice has been the subject to intensive breeding. More recently, during the Green Revolution (late 1960s), major genetic improvements contributed to unprecedented yield increase (Khush, 2001). IR36 and IR64 were the most popular rice varieties created during the second phase of the Green Revolution. IR36 became one of the most widely grown varieties of rice with 11 million ha yr^{-1}. IR64 replaced IR36 as the world's most popular rice variety, and is still widely grown. Their genealogies are well documented. Breeders used several traditional rice varieties as well as some wild rice accessions to create these two varieties. Apart from transferring the semidwarf phenotype, their objective was to incorporate various resistance traits while preserving grain quality and high yield. In particular, they incorporated the resistance to the grassy stunt virus and its vector the Brown Plant Hopper (BPH) from an Indian wild rice accession (*Oryza rufipogon* Griff. (IRGC101508)). The use of wild species to integrate resistance or tolerance to biotic and abiotic stresses is fairly common in rice (Brar & Khush, 1997) and other crop species. Many resistance traits were introduced in cultivated rice from various rice species (Brar & Khush, 1997). However, other genes linked to the gene of interest were also introgressed during this process. This phenomenon

*These authors contributed equally to this work.

is known as linkage drag (Brinkman & Frey, 1977). Although wild species offer an important potential for improvement, breeders have sometimes refrained from using them because of the severe effect on phenotype of genes introgressed by linkage drag (Young & Tanksley, 1989). To eliminate these undesired genes, backcrossing is commonly used in crop plants (Young & Tanksley, 1989). However, by conventional backcrossing, linkage drag is reduced slowly, with an average introgression size of 20 cM after 10 backcrosses (Naveira & Barbadilla, 1992). Marker assisted selection (MAS) was proposed to reduce the size of introgressions more rapidly and more efficiently (Young & Tanksley, 1989; Hospital, 2001). Theoretical models predict the size of such introgressions after several backcrosses in the presence or absence of selection (Naveira & Barbadilla, 1992). Many important characters have been introgressed in cultivars by backcrossing (Young & Tanksley, 1989). However, despite their potential importance in breeding, the real size of introgressions around selected genes has seldom been measured in cultivated plants.

The resistance gene *Pi33* confers resistance to the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, and corresponds to the *ACE1* avirulence gene (Berruyer *et al.*, 2003; Böhnert *et al.*, 2004). *Pi33* was previously mapped on the short arm of rice chromosome 8 (Berruyer *et al.*, 2003) and then finely mapped within a 0.4 cM between two microsatellite markers (Fig. 1) (E. Ballini *et al.* unpublished). This region corresponds to 240 kb in the sequenced cultivar Nipponbare and includes a cluster of resistance gene analogues (Fig. 1) (E. Ballini *et al.* unpublished). The corresponding avirulence gene *ACE1* was characterized (Dioh *et al.*, 2000; Böhnert *et al.*, 2004). This gene encodes a large cytoplasmic enzyme (Ace1) involved in secondary metabolism that is specifically expressed in appressoria (Böhnert *et al.*, 2004; Fudal *et al.*, 2006). *Pi33* was identified in different rice varieties including IR64 (Berruyer *et al.*, 2003) but not in the related cultivar IR36. Since *Pi33* locus has been well characterized using different genetic markers, we have searched for the origin of *Pi33* in IR64 genealogy.

In this study, the phenotypic and molecular characterization of parents from IR64 genealogy for their *Pi33* locus and the identification of the possible *Pi33* donor parent are described. Varieties or lines involved in IR64 genealogy were screened for the presence of *Pi33* using pairs of transgenic avirulent and virulent *M. grisea* tester isolates. The landrace rice variety Tsai Yuan Chung and two accessions of the wild rice species *O. rufipogon* were identified as potential sources of resistance. Genotyping and sequencing of the *Pi33* locus from *O. rufipogon* accession IRGC101508 confirmed that this wild rice parent has transmitted its *Pi33* resistance allele to IR64. The *O. rufipogon* introgression was then characterized in IR64 and the related variety IR36, mapped by genotyping and the size of this introgression was measured. This introgression spans over a large region of the short arm of chromosome 8 in both varieties. To our knowledge, this is the first description of such a large alien introgression in rice.

Materials and Methods

Magnaporthe grisea strains and culture

Pairs of avirulent and virulent isogenic strains previously described (Berruyer *et al.*, 2003; Böhnert *et al.*, 2004) were used in this study to detect *Pi33* in rice varieties. The cosmid D31C12 from the avirulent strain 96/0/76 carrying the avirulence gene *ACE1* (Böhnert *et al.*, 2004) was introduced by transformation in *M. grisea* virulent strains PH14, PH19 and 2/0/3. Several avirulent transformants were obtained, and one was selected for each virulent strain. *Magnaporthe grisea* strains were grown for 7–10 d on rice flour agar medium (agar 15 g l^{-1}, rice flour 20 g l^{-1}, yeast extract 2.5 g l^{-1}, penicillin 500 000 IU l^{-1}, pH 6) at 26°C. Conidia were harvested by flooding the plate with 10 ml of sterile distilled water.

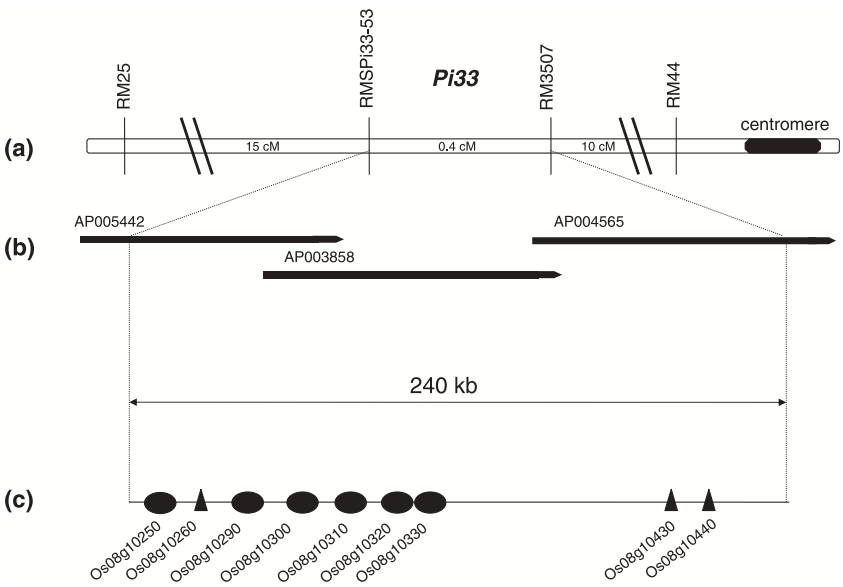


Fig. 1 Genetic and physical map of *Pi33*. (a) High resolution mapping of *Pi33*. Mapping was realized with 750 DH and SSD progeny from the cross IR64 × Azucena. RMx are simple sequence repeats (SSRs) markers used for genetic mapping. Genetic distances between markers are indicated in cM. (b) *In silico* assembly of bacterial artificial chromosome (BAC) clones of Nipponbare across *Pi33* region. (c) *Pi33* cluster of resistance gene analogues. Gene prediction and numbers were obtained from TIGR. LRR-Kinases are represented by black circles and NBS-LRRs by triangles.

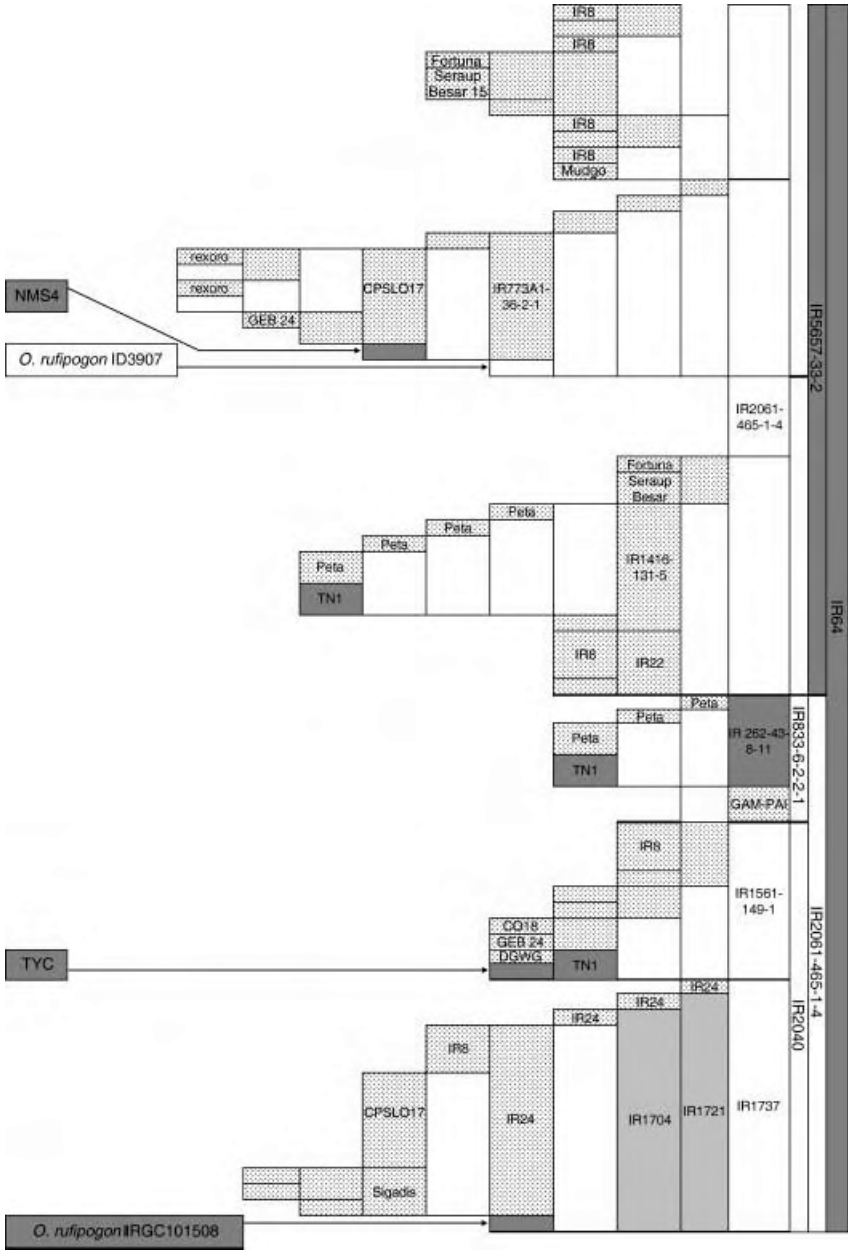


Fig. 2 Detection of *Pi33* in IR64 genealogy. Each box, regardless of its size, represents a variety that was used as a parent for the next generation. Varieties with or without *Pi33* are represented as dark grey and dotted boxes, respectively. Sister lines supposed to carry *Pi33* are light grey. Varieties that were not tested because they were not available are clear. The four initial candidate donors of *Pi33* (Tsai Yuan Chung, TYC; *Oryza rufipogon* IRGC101508, *O. rufipogon* DW561 and Nahng-Mon S4) are indicated on the left.

Rice varieties and lines, rice cultivation and pathogenicity assay

It has been shown previously that IR64 carries the blast resistance gene *Pi33* (Berruyer *et al.*, 2003) whereas IR36 does not (this study). The complex genealogies of IR64 and IR36 were rebuilt using the IRIS database (Figs 2 and 3; http://www.iris.irri.org/). Thirty-eight varieties or lines used in the IR64 breeding scheme were obtained from the Genetic Resources Centre of the International Rice Research Institute (IRRI). They were screened for the presence of *Pi33* with the resistance assay described below (Table 1). Some of the IR64 progenitors were not available. In three cases, sister lines of these progenitors were obtained and tested.

Rice plants were grown in glasshouse or in phytotron at 25 ± 3°C), with a relative humidity of 70% and supplemented with light. Methods of rice cultivation and inoculation were as described in Berruyer *et al.* (2003). The resistance gene *Pi33* corresponding to the avirulence gene *ACE1* was identified using pairs of isogenic strains of *M. grisea* differing only in their alleles of the *ACE1* gene (Berruyer *et al.*, 2003; Böhnert *et al.*, 2004). Resistance assays were repeated two or three times. Symptoms were observed 7 d after inoculation and lesion type was scored according to a standard reference scale

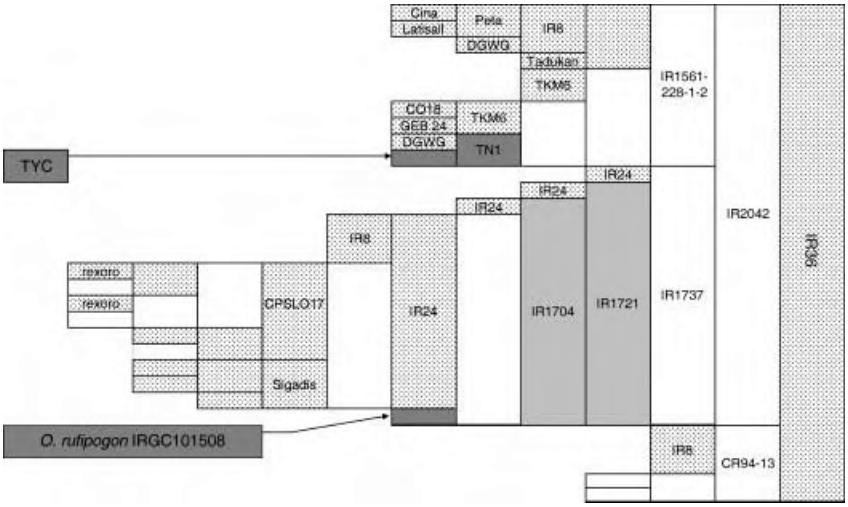


Fig. 3 Detection of *Pi33* in IR36 genealogy. Each box, regardless of its size, represents a variety that was used as a parent for the next generation. Varieties with or without *Pi33* are represented as dark grey and dotted boxes, respectively. Sister lines supposed to carry *Pi33* are light grey. Varieties that were not tested because they were not available are clear. The two candidate donors of *Pi33* (Tsai Yuan Chung, TYC; *Oryza rufipogon* IRGC101508) are given on the left. Although, TYC and *O. rufipogon* IRGC101508 carry the resistance gene *Pi33*, this gene was lost in the progenies of crosses with TYC and *O. rufipogon* IRGC101508.

(Silué *et al.*, 1992). After inoculation of the two isogenic strains, three possible reactions were observed: (1) the rice line was resistant to both strains and no conclusion could be drawn about the presence of *Pi33* (in this case, other pairs of isogenic strain were used); (2) the rice line was susceptible to both strains and thus did not carry *Pi33*; (3) the rice line was susceptible to the untransformed strain and resistant to the transformed strain carrying the avirulence gene *ACE1*. In the last case, it was concluded that the rice line tested carries *Pi33*. It was assumed that since each line derives from a cross between two parents, if one line carries *Pi33*, one of its parents must carry *Pi33*. Once the donor parent is identified, its ancestors can be tested for *Pi33*, and so on, until all the primary varieties used in the pedigree have been checked.

Genotyping of rice varieties

Genomic DNA from the different rice lines or varieties was extracted following the standard protocol used by Berruyer *et al.* (2003). Twenty-nine simple sequence repeat (SSR) markers (see the Supplementary Material, Table S1) evenly distributed over the short arm of rice chromosome 8 were chosen in the Gramene database (http://www.gramene.org/). Seven additional SSR markers were designed close to the *Pi33* locus. Seven additional SSR markers (Table S1) distributed on the other rice chromosomes were chosen among 20 markers that were polymorphic on a set of diverse indica and japonica varieties (data not shown). SSR markers were amplified following published polymerase chain reaction (PCR) protocols (Temnykh *et al.*, 2000). The PCR products were separated by gel electrophoresis using 3% agarose for 2.5 h at 100 V. For each SSR marker, bands of different sizes were interpreted as different alleles and a number was assigned to each allele. Similarity between varieties was calculated using the Sokal and Michener distance (Sokal & Michener, 1958) with multilocus genotypes as input data. In order to visualize the genetic similarity between varieties a dendrogram was constructed using the neighbour joining clustering method. Bootstrap values were calculated with 1000 iterations. All computations and constructions were performed with the DARWIN 4.0 software (Perrier *et al.*, 2003; Perrier & Jacquemoud-Collet, 2005).

The *Pi33* locus was previously mapped to a 240 kb region between markers RMS*Pi33*–53 and RM3507 (Fig. 1) (E. Ballini *et al.* unpublished). In Nipponbare, nine candidate genes (three NBS-LRR and six LRR-kinase) were identified in this genomic region: (TIGR:Os08g10250, TIGR:Os08g10260, TIGR:Os08g10290, TIGR:Os08g10300, TIGR:Os08g10310, TIGR:Os08g10320, TIGR:Os08g10330, TIGR:Os08g10430 and TIGR:Os08g10440). A primer pair was designed for each gene with the PRIMER 3 software (Rozen & Skaletsky, 2000). IR36, IR64, *O. rufipogon* (IRGC101508) and Tsai Yuan Chung (TYC) DNA were amplified following published PCR protocols (Temnykh *et al.*, 2000). The PCR products were then sequenced by Genome express (http://www.genome-express.com). Sequence alignments were made with CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994).

Estimation of the physical size of the introgression

The SSR markers from the short arm of chromosome 8 were mapped on the Nipponbare rice genome sequence. A first estimation of the physical size of the introgression could be done, based on the position of the genetic markers in the *O. sativa* genome. However, because of putative genome reorganization or expansion, the physical distance between two markers could be different in the *O. rufipogon* genome, the donor species of *Pi33*. To address this, the information available on wild rice genomes (OMAP project; http://www.omap.org) was used. Two accessions of *O. rufipogon* are available in the OMAP project: *O. rufipogon* IRGC105491 and *Oryza nivara* (the annual form of *O. rufipogon*) IRGC100897.

Table 1 Presence of the resistance gene *Pi33* in varieties used in the breeding process leading to IR64

Variety	IRGC	Source	Origin	Type	Subspecies	Pi33
Benong	13530	IRRI	Indonesia	IR64 progenitor	Japonica	Absence of *Pi33*
Bluebonnet	1799	IRRI	USA	IR64 progenitor	Japonica	Absence of *Pi33*
BPI-121-407	15762	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica?	Absence of *Pi33*
BPI76	39	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Cina	17435	IRRI	Indonesia	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
CO18	6331	IRRI	India	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
CPSLO17	76301	IRRI	USA	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Dee-Geo-Woo-General	123	IRRI	Taiwan	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Fortuna	139	IRRI	Taiwan	IR64 progenitor	Japonica	Absence of *Pi33*
Gam-Pai-30-12-15	831	IRRI	Thailand	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
GEB 24	4898	IRRI	India	IR64 progenitor	Indica?	Absence of *Pi33*
IR1416-131–5	32607	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
IR22	11356	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
IR24	19907	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
IR262-43-8-11	10947	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Presence of *Pi33*
IR5657-33-2	7792	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Presence of *Pi33*
IR579-48-1-2 (Nilo11)	11371	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
IR773A-1-36-2-1	11374	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
IR8	17	CIRAD	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Latisail	4803	IRRI	India	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Mudgo	6663	IRRI	India	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Oryza rufipogon IRGC101508	101508	IRRI	India	IR64 progenitor	Indica	Presence of Pi33
Peta	35	IRRI	Indonesia	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Rexoro	143	IRRI	USA	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Schow Sung	2253	IRRI	Korea	IR64 progenitor	Japonica	Absence of *Pi33*
Seraup Besar 15	14468	IRRI	Malaysia	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Sigadis	611	IRRI	Indonesia	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
SLO 17	637	IRRI	India	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Tadukan	9804	IRRI	Philippines	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Taichung Native 1	105	IRRI	Taiwan	IR64 progenitor	Indica	Presence of *Pi33*
Tetep	32576	IRRI	Vietnam	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Texas Patna	144	IRRI	USA	IR64 progenitor	Japonica	Absence of *Pi33*
TKM 6	237	IRRI	India	IR64 progenitor	Indica	Absence of *Pi33*
Tsai Yuan Chung	126	IRRI	Taiwan	IR64 progenitor	Indica	Presence of *Pi33*
IR1704-13-3-2	32641	IRRI	Philippines	Sister line of IR64 progenitor	Cross	Absence of *Pi33*
IR1704-3-2-3	32640	IRRI	Philippines	Sister line of IR64 progenitor	Cross	Presence of *Pi33*
IR1721-11-13-25-2-3	32644	IRRI	Philippines	Sister line of IR64 progenitor	Cross	Presence of *Pi33*
IR1721-11-6-8-3-2	32643	IRRI	Philippines	Sister line of IR64 progenitor	Cross	Presence of *Pi33*
IR1737-19-7-8-3	32645	IRRI	Philippines	Sister line of IR64 progenitor	Cross	Presence of *Pi33*

IRRI, International Rice Research Institute; CIRAD, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

First, we looked for major reorganization between *O. sativa* and *O. rufipogon*/*O. nivara* in the genomic region corresponding to the introgression. We considered the order of *O. rufipogon* IRGC105491 and *O. nivara* IRGC100897 bacterial artificial chromosome (BAC) clones either deduced from BAC end sequences anchored on the *O. sativa* genome or deduced from BAC fingerprinting. Second, we tried to identify possible reduction in genome size between *O. sativa* and *O. rufipogon*/*O. nivara*. The genome size of *O. rufipogon* IRGC105491 and *O. nivara* IRGC100897 provided by the OMAP project was compared with the *O. sativa* Nipponbare sequence (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Third, we verified that in the particular region studied, there was no major reduction in size between *O. sativa* and *O. rufipogon*/*O. nivara*. The average density of BAC ends per Mb was calculated using the OMAP data. We counted the number of BAC ends and evaluated the BAC end density in the region corresponding to the introgression (from 4 to 9 Mb of chromosome 8). This was compared with the data on the whole genome provided by the OMAP project.

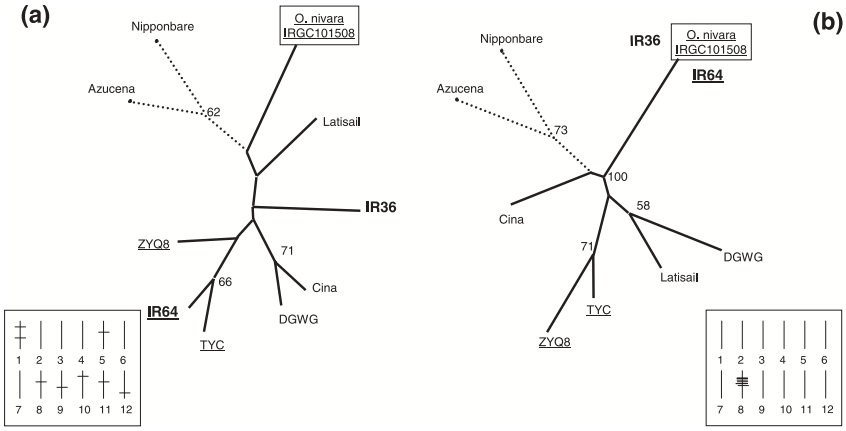


Fig. 4 Genetic relatedness of varieties assessed with (a) markers dispersed on the genome or (b) markers near the *Pi33* locus. The dendrograms on the left and right were constructed, respectively, with eight simple sequence repeat (SSR) markers distributed on the genome and eight SSR markers surrounding the *Pi33* locus. Japonica and indica varieties are at the top of dotted and plain line branches, respectively. The wild rice accession *Oryza rufipogon* IRGC101508 is framed. Varieties with *Pi33* are underlined. Numbers represent the bootstrap values. Position on rice chromosomes of markers used to construct the dendrogram are represented schematically in the boxes below the dendrograms. DGWG, Dee-Geo-Woo-Gen; TYC, Tsai Yuan Chung; ZYQ8, Zhai-Ye-Qing 8.

Results

Three possible sources of the resistance gene *Pi33* in the IR64 genealogy

We analysed the genealogy in the creation of IR64 to identify the original donor of *Pi33* and follow its transmission across the different generations. The presence of *Pi33* in the rice lines or varieties was assessed by resistance assays (see the Materials and Methods section).

The genealogy of IR64 and the results of the resistance assay are summarized in Fig. 2. Some of the IR64 progenitors could not be tested because they were not available from the IRRI germplasm bank. Thirty-eight lines taken from IR64 genealogy were screened. Nine varieties carried *Pi33*. Four accessions were identified as the potential primary donors of *Pi33* in the IR64 genealogy: *O. rufipogon* DW561, Nahng-Mon S4 (NMS4), *O. rufipogon* IRGC101508 and the landrace Tsai Yuan Chung (TYC). We were unable to assay the presence of *Pi33* in some lines of IR64 genealogy, in particular *O. rufipogon* DW561, as they were not available. IR64 could have received *Pi33* from IR5657-33-2 (Fig. 2) which was shown to carry *Pi33*. In that case, *O. rufipogon* DW561, TYC (via IR262-43-8-11 and Taichung Native 1 (TN1)), and *O. rufipogon* IRGC101508 (via IR1721, and IR1704) are possible original donors. Alternatively, IR64 could have received *Pi33* from IR2061-465-1-4 (Fig. 2). We could not test this line directly, but its genealogy indicates that its ancestors carry *Pi33*. In this case TYC (via IR262-43-8-11 and TN1) and *O. rufipogon* IRGC101508 (via IR1721, and IR1704) are the possible original donors. NMS4 was discarded as a possible donor of *Pi33* since its progeny, such as IR773 A 1-36-2-1, do not carry *Pi33*. Conversely, the other three putative parents cannot be discarded as potential donors, since at least one of their progeny (IR5657-33–2) carries *Pi33*.

In order to identify the original donor of *Pi33,* we genotyped IR64 and the two potential donors available. Since the genomic fragment in IR64 originates from the donor, the genotypes of the donor and of IR64 are expected to be very similar (if not identical) at the *Pi33* locus.

Pi33 was introgressed in IR64 from *O. rufipogon* IRGC101508

The varieties IR64, TYC and *O. rufipogon* IRGC101508 were genotyped with 16 microsatellite markers either linked to *Pi33* (eight markers) or dispersed in the rice genome (eight markers). Two japonica varieties (Azucena and Nipponbare) and six indica varieties were also genotyped with the same markers to assess the level of genetic diversity of each marker. The genotyping results are presented in two dendrograms (Fig. 4). The first dendrogram (Fig. 4a) was constructed with the results of eight SSR markers dispersed in the genome. Related varieties that share the highest number of common markers are grouped on the same branch of the dendrogram. As expected with randomly distributed markers, *O. rufipogon, O. sativa* japonica and *O. sativa* indica are clustered as three distinct groups. These results are in agreement with previous classifications of rice varieties (Cheng *et al.*, 2003; Garris *et al.*, 2005). These results also confirm that, if the whole genome is considered, IR64 is genetically closer to the other semidwarf indica varieties than to the *O. rufipogon* or *O. sativa* japonica accessions. The second dendrogram (Fig. 4b) was constructed with the results of eight SSR markers linked to *Pi33*. This dendrogram reflects the genetic similarity of the varieties at the *Pi33* locus. The eight SSR markers indicate

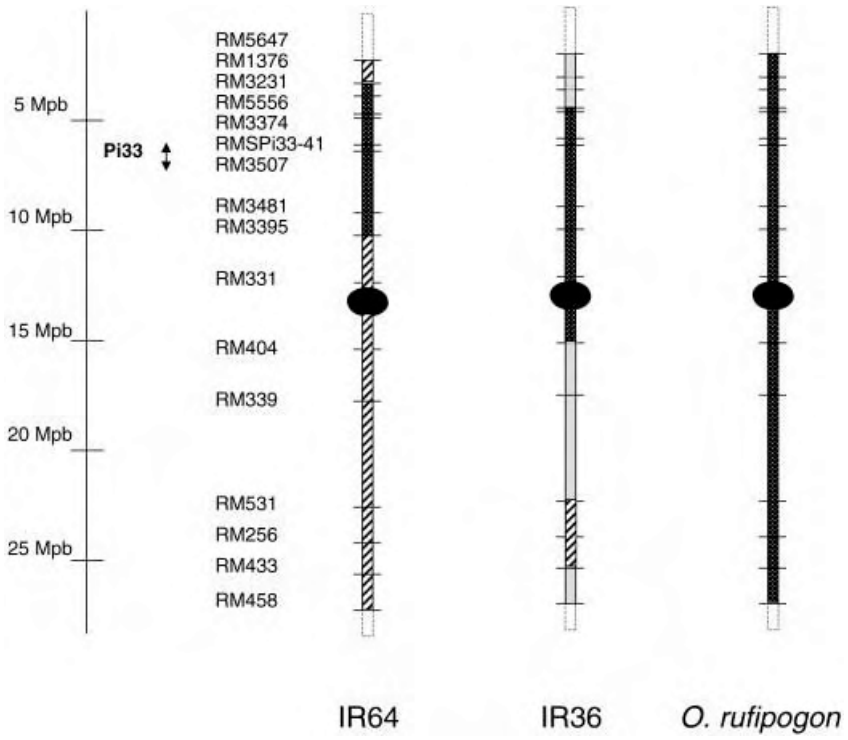


Fig. 5 Origin of chromosome 8 in rice varieties IR36 and IR64. Thirty-seven microsatellite markers (RM) regularly distributed over the chromosome 8 were used between RM5647 and RM458. The clear part (telomeres) was not genotyped. Genomic regions between two markers with an *O. rufipogon* allele are represented by black with white dotted bars. Genomic regions with IR64 and IR36 specific alleles are in striped and grey bars, respectively. Black disk represents the centromere.

that IR64 and IR36 are genetically identical to the potential donor of resistance *O. rufipogon* IRGC101508, whereas they strongly differ from the other potential donor, TYC. These results strongly suggest that *O. rufipogon* IRGC101508 is the original donor of *Pi33* in IR64 genealogy. They also show that IR36, which shares part of its ancestors with IR64 (Figs 2 and 3) but does not carry *Pi33*, has an introgression of *O. rufipogon* IRGC101508 at the *Pi33* locus.

Partial sequences of the nine resistance genes analogues (RGA) clustered at *Pi33* locus were obtained from these varieties, allowing a comparison of 5 kb genomic sequence dispersed on 240 kb (Fig. 1). The sequences from IR64, IR36 and *O. rufipogon* IRGC101508 were identical whereas an average polymorphism of 2% was detected between *Pi33* locus sequences from IR64 and TYC. These data support the hypothesis that *O. rufipogon* IRGC101508 is the parent that has transmitted *Pi33* to IR64. Furthermore, it shows that IR36 has an *O. rufipogon* introgression similar to IR64 at *Pi33* locus, although it does not carry *Pi33*, as determined by inoculation test. This unexpected result suggests that the *Pi33* gene from IR36 has been mutated (susceptible allele) or specifically lost during the breeding process.

IR64 and IR36 contain a large introgression from *O. rufipogon* IRGC101508

The *O. rufipogon* IRGC101508 introgression was better characterized using 37 additional SSR markers distributed all over the chromosome 8. These markers are polymorphic within *O. sativa* species, with an average of five distinguishable alleles per locus. Twenty-two contiguous markers did not show any polymorphism between IR36, IR64 and *O. rufipogon* IRGC101508, whereas four and five additional markers were not polymorphic either between IR36 and *O. rufipogon*, or between IR64 and *O. rufipogon*, respectively. The genotype of TYC at the *Pi33* locus was different from IR64 for 26 markers out of the 37 tested. This latter ratio of polymorphic markers is similar to the ratio obtained when two genetically distinct indica lines, such as Cina, Latisail or TYC, are compared. This result supports the conclusion that, *Pi33* in IR64 was introgressed from *O. rufipogon* IRGC101508 rather than from TYC.

Mapping on Nipponbare rice genome sequence shows that the SSR markers for which the *O. rufipogon* IRGC101508 and IR64 allele is identical are contiguous and span over 7 Mbp. This introgression represents approximately half of the short arm of rice chromosome 8 (Fig. 5). However, owing to genome reorganization or expansion, the physical distance between two markers could be different in the *O. rufipogon* genome, the donor species of *Pi33*. To address this question, we used the information available on wild rice genomes (OMAP project; http://www.omap.org; see the Materials and Methods section). Comparing the genomic region corresponding to the introgression, we did not identify major reorganization between *O. sativa* and *O. rufipogon* (data not shown). Moreover, the genome size of *O. rufipogon* accession IRGC105491 and *O. nivara* accession IRGC100897 provided by the OMAP project are 439 Mb and 448 Mb, respectively. So, at the whole-genome level, these species have larger sizes

than *O. sativa* (389 Mb). We also verified that in the particular region studied, there was no major reduction in size between *O. sativa* and *O. rufipogon*/*O. nivara*. We evaluated the density of BAC end sequences anchored in the region corresponding to the introgression (from 4 to 9 Mb of chromosome 8). We obtained a density of BAC end sequences of 177.6 and 218.6 for *O. rufipogon* IRGC105491 and *O. nivara* IRGC100897, respectively. For *O. rufipogon* IRGC105491 and *O. nivara* IRGC100897, 58 778 and 85 864 BAC end sequences have been anchored on the Nipponbare genome sequence. Thus, the average density of BAC ends per Mb of *O. sativa* sequence is 158.0 and 230.8, respectively. So, the densities estimated for the introgression region are similar to the average density calculated over the whole genome for *O. rufipogon* IRGC105491 and *O. nivara* IRGC100897, respectively. Overall, the ratio between the physical distance of syntenic regions between *O. sativa* and *O. rufipogon*/*O. nivara* is not significantly different in the region under study compared with the whole genome. Therefore, the use of the Nipponbare sequence to estimate the physical size of the introgression is likely to give a slight underestimate of the real physical size in *O. rufipogon* and, consequently, of the introgression in IR64.

The sizes of the introgressions in IR36 and IR64 were slightly different. The introgression in IR36 is between markers RM5556 and RM3374 on one side and markers RM331 and RM404 on the other, which are a minimum size of 7.6 Mbp and a maximum size of 10.7 Mbp. The introgression in IR64 is between markers RM1376 and RM3231 on one side and RM3481 and RM3395 on the other, which are a minimum size of 5.3 Mbp and a maximum size of 7.1 Mbp. The overlapping region between introgressions in the two varieties is 4.5 Mbp. These results suggest that, despite several backcrosses in IR64 and IR36 genealogies, a large introgression of wild rice *O. rufipogon* IRGC101508 was maintained during the breeding process, leading to the creation of these varieties.

Discussion

It was shown that *O. rufipogon* IRGC101508 is the donor of the resistance gene *Pi33* in IR64. We have also identified a strong genetic similarity between IR64 and *O. rufipogon* IRGC101508 over the 240 kb of *Pi33* locus (identical SSRs and absence of sequence polymorphism over a total of 5 kb). This contrasts with the average 2% polymorphism observed between *O. sativa* indica variety TYC and *O. rufipogon*. Other resistance genes to bacterial blight (*Xa21* from *O. longistaminata*, *Xa23* from *O. rufipogon* and *Xa27* from *O. minuta*) and blast disease (*Pi9* from *O. minuta*) have been introgressed from different wild rice species into cultivated rice (Brar & Khush, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 2004). These genes have been maintained during the domestication process, and are likely to have coevolved for a long time with the corresponding avirulence genes in the pathogen. The study of the origin and diversity of such genes might bring new insights into resistance durability.

We have also identified an introgression of at least 5.3 Mbp and 7.6 Mbp of *O. rufipogon* IRGC101508 wild rice in the cultivated rice varieties IR64 and IR36, respectively. Such a large introgression is not expected because, in crosses between wild and cultivated species, the size of introgressions could be restricted by recombination deficiency. However, limited recombination probably depends more on genetic similarity than on the fact that crosses are intraspecific or interspecific. The recombination in tomato around the *Tm2* and *Mi* resistance genes between intraspecific and interspecific crosses of *Lycopersicum* was compared by Ganal & Tanksley (1996). They concluded that it is not possible to state that, in general, intraspecific crosses have more recombination than interspecific ones. It was shown by Brar & Khush (1997) that, in rice, in crosses between cultivated rice and relatively distant wild species, the introgressed fragment was probably reduced because of a lack of recombination between the two genomes. In particular, rapid elimination of the wild species genomes was shown in crosses between wild species with genomes C, E, F and G and *O. sativa* (genome AA). However, rapid reduction of the size of introgressions is expected at a slower rate in crosses between *O. rufipogon* and *O. sativa*, because both species share AA genome. Indeed, interspecific crosses with AA genome occur at a variable efficiency and chromosome pairing can be variable.

Statistically, the maintenance of such a large introgression can be explained as a result of selection. Indeed, in the absence of selection, the genome of the initial donor after four backcrosses is expected to be randomly distributed and to account for 3% of the genome. This proportion falls to 0.8% after six backcrosses. In the genealogy of IR64, *O. rufipogon* IRGC101508 was crossed with IR24, and then the progeny were backcrossed three times with IR24. This was followed by three additional crosses with other lines. Thus, the probability of having maintained, only by chance, more than 25% of the rice chromosome 8 from *O. rufipogon* IRGC101508 after six crosses is very low. So, we must consider that, at least, one *O. rufipogon* favourable allele of a gene located on the short arm of chromosome 8 was selected. In this case, such a large introgression is in agreement with the predicted size after six crosses (Naveira & Barbadilla, 1992). This phenomenon was described by Brinkman & Frey (1977) as 'linkage drag'. Through conventional backcrossing, linkage drag is reduced slowly with an average introgression size of 20 cM after 10 backcrosses (Naveira & Barbadilla, 1992). Both IR64 and IR36 were created in order to obtain semidwarf indica varieties resistant to several diseases and pests. One of the main objectives was to introduce resistance to the grassy stunt virus and to its parasitic insect vector, the brown plant hopper (*Nilaparvata lugens*, BPH). The *O. rufipogon* IRGC101508 wild rice has been used as a source of resistance to BPH. The resistance gene *Gsv* to the grassy stunt virus (Khush & Ling, 1974) has been introduced from *O. rufipogon*, but its chromosome location is

unknown (G. Khush, pers. comm.). Although IR64 has the resistance gene *BPH1* as well as other genes for partial resistance to BPH, to date, no resistance gene or quantitative trait loci (QTL) have been detected on the short arm of chromosome 8 in IR64 (Alam & Cohen, 1998). Therefore BPH resistance does not seem to have played a role in maintaining an introgression of *O. rufipogon* IRGC101508 on chromosome 8 by linkage drag. Resistance to blast was also selected during the breeding process leading to IR36 and IR64. So, *Pi33*, which is located in the middle of the introgression in IR64, could be responsible for maintaining the introgression in IR64. This explanation does not work for IR36 which, based on its phenotype, does not express resistance to *ACE1* avirulent strains. Only one other resistance quantitative trait locus to blast has been described in IR64 on the short arm of chromosome 8 (*Pi29*(t); Sallaud *et al.*, 2003). Other resistance genes to blast have been mapped in this region in other varieties (*Pi11* = *PiZh* Zhu *et al.*, 1993; *Pi36(t)* Liu *et al.*, 2005). In the genome sequence of Nipponbare corresponding to the short arm of chromosome 8, apart from the *Pi33* locus, at least 27 candidate genes can be identified. Altogether, these resistance genes to blast are dispersed over the short arm of chromosome 8, and might be responsible for maintaining an introgression under selection pressure. Of course, resistance to blast is not the only trait that might have been selected. In the overlapping genomic region of IR36 and IR64 introgressions, 874 genes are predicted from the Nipponbare sequence (Gene search tool of OryGenesDB; Droc *et al.*, 2006; http://orygenesdb.cines.fr applied on TIGR annotation). When transposon, retrotransposon, and genes coding for putative protein with unknown functions are removed from this list, the 185 remaining putative genes encode for more than 100 different potential functions. Since selection on a single gene could explain our results, any gene contributing to a selected traits and localized in the region introgressed from *O. rufipogon* IRGC101508 could be responsible for maintaining such a large introgression.

The relative importance and origin of introgressions in varieties of cultivated plants is poorly documented. To our knowledge, this is the first report of such a large introgression in a cultivated variety of rice. Moreover, this phenomenon has rarely been described in cereals. Even if we extend to dicots, examples of large introgressions of wild species in cultivated varieties are limited. In tomato, several commercial varieties have been genotyped by restriction fragment length polymorphism (RFLP) in order to identify the size of the fragments introgressed during various programmes of selection of the *Tm-2* tomato mosaic virus resistance gene (Young & Tanksley, 1989). These authors found that in one particular variety, an introgression of 51 cM was maintained after 11 backcrosses. This introgressed fragment represented the entire short arm of tomato chromosome 9. In soybean, the origin of introgressed fragments in a commercial cultivar was investigated (Sharpe & Lydiate, 2003). The cultivar studied had been obtained by a cross followed by pedigree selection. In this cultivar, some introgressions linked, or not, to the selected trait were detected. Some of these introgressions seemed relatively large but the exact size was not determined. So, experimental data on the physical size of introgressions in cultivated plants after breeding remains to be documented.

Both IR36 and IR64 are expected to share the same alleles at all loci in the introgressed fragment. The introgression largely spans over *Pi33* locus. Therefore, IR36 and IR64 are expected to have the same phenotype for *Pi33*. However, we showed that IR36 is not resistant to isolates carrying the *Ace1* avirulence allele, whereas IR64 is. This unexpected result could be explained by either a suppressor gene or a mutation in IR36. For example, suppressors of specific resistance genes to fungal (*Rcr3*/*Cf2*) and nematode (*Rme*/*Mi*) species have been reported in tomato (Martin *et al.*, 2003). Suppressors of specific resistance to leaf and stem rust (*Lr34*; Kerber & Aung, 1999; Knott, 2000) and powdery mildew (*Pm8* and *Pm17*; Zeller & Hsam, 1996) have also been reported in wheat. Analysing the progeny of a cross between IR36 and a susceptible variety is needed to test this hypothesis. If the alternative hypothesis of a mutation is true, then detecting this mutation might be a way to identify *Pi33* among the candidate genes identified at the locus.

Conclusions

In rice, wild species have been used as sources of resistance to pests and diseases. In crosses between different species and in the absence of selection, wild rice genome introgressions are expected to be small. Here we show that a large introgression from wild rice in a cultivated variety of rice was maintained, despite several backcrosses. Such a large introgression is likely to have been maintained during backcrossing only if a selection pressure was exerted on this genomic region. The blast resistance gene *Pi33* might have been selected during the breeding process leading to IR64, although linkage drag due to the selection of other genes in the vicinity cannot be excluded.

Acknowledgements

We thank Henri Adreit, Amandine Bordat, Julien Frouin, and Joëlle Milazzo for their excellent technical assistance. We also thank Olivier Panaud for encouraging us to study the *Pi33* introgression in detail and for reviewing the manuscript. Many thanks to Rod Wing and Jose Luis Goicoechea for providing us with information on the physical maps of wild rice species. We are grateful to Dr Darshan Brar for the fruitful discussions about our results. We thank Dr Gurdev Khush for providing information on the varieties. We thank the Genetic Resources Centre of IRRI for providing most of the rice varieties used in this study. E.B. and R.B. were supported by grants from CIRAD and from the French Ministry of Education and Research.

References

Alam SN, Cohen MB. 1998. Detection and analysis of QTLs for resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in a doubled-haploid rice population. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 1370–1379.

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH, Tharreau D. 2003. Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 1139–1147.

Böhnert HU, Fudal I, Dioh W, Tharreau D, Notteghem J-L, Lebrun M-H. 2004. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. *Plant Cell* **16**: 2499–2513.

Brar DS, Khush GS. 1997. Alien introgression in rice. *Plant Molecular and Biology* **35**: 35–47.

Brinkman MA, Frey KJ. 1977. Yield component analysis of oat isolines that produce different grain yields. *Crop Science* **17**: 165–168.

Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice. *Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 553–567.

Cheng C, Motohashi R, Tsuchimoto S, Fukuta Y, Ohtsubo H, Ohtsubo E. 2003. Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersion pattern of SINEs. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 67–75.

Dioh W, Notteghem JL, Orbach M, Lebrun MH. 2000. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. *Molecular Plant–Microbe Interaction* **13**: 217–227.

Droc G, Ruiz M, Larmande P, Pereira A, Piffanelli P, Morel JB, Dievart A, Courtois B, Guiderdoni E, Perin C. 2006. OryGenesDB: a database for rice reverse genetics. *Nucleic Acids Research* **34** (Database issue): D736–740.

Fudal I, Collemare J, Böhnert HU, Melayah D, Lebrun MH. 2006. Expression of *M. grisea* avirulence gene *ACE1* is connected to the initiation of appressorium mediated penetration. *Eukaryotic Cell* **6**: 546–554.

Ganal MW, Tanksley SD. 1996. Recombination around the *Tm2a* and *Mi* resistance genes in different crosses of *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 101–108.

Garris A, Tai T, Coburn J, Kresovich S, McCouch SR. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* **169**: 1631–1638.

Gu K, Tian D, Yang F, Wu L, Sreekala C, Wang D, Wang GL, 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.

Hospital F. 2001. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. *Genetics* **158**: 1363–1379.

International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793–800.

Kerber ER, Aung T. 1999. Leaf rust resistance gene *Lr34* associated with nonsuppression of stem rust resistance in the wheat cultivar Canthatch. *Phytopathology* **89**: 518–521.

Khush GS. 2001. Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics* **2**: 815–822.

Khush GS. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* **59**: 1–6.

Khush GS, Ling KC. 1974. Inheritance of resistance to grassy stunt virus and its vector in rice. *Journal of Heredity* **65**: 134–136.

Knott DR. 2000. Inheritance of resistance to stem rust in Medea durum wheat and the role of suppressors. *Crop Science* **40**: 98–102.

Liu XQ, Wang L, Chen S, Lin F, Pan QH. 2005. Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. *Molecular Genetics and Genomics* **274**: 394–401.

Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 23–61.

McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck 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.

Naveira H, Barbadilla A. 1992. The theoretical distribution of lengths of intact chromosome segments around a locus held heterozygous with backcrossing in a diploid species. *Genetics* **130**: 205–209.

Oka HL, Wang WT. 1962. Rice varieties intermediate between wild and cultivated forms and the origin of the japonica type. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **3**: 109–131.

Perrier X, Flori A, Bonnot F. 2003. Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC, eds. *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Enfield, NH, USA: Science Publishers, 43–76.

Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. 2005. *User's Manual for Darwin 5.0.* (http://darwin.cirad.fr/darwin/index.html)

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**: 365–386.

Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Ghesquiere A, Notteghem JL. 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 794–803.

Sharpe AG, Lydiate DJ. 2003. Mapping the mosaic of ancestral genotypes in a cultivar of oilseed rape. *Brassica napus*. selected via pedigree breeding. *Genome* **46**: 461–468.

Silué D, Tharreau D, Nottéghem J-L. 1992. Identification of *Magnaporthe grisea* avirulence genes to seven rice cultivars. *Phytopathology* **82**: 1462–1467.

Sokal RR, Michener CD. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin* **38**: 1409–1438.

Temnykh S, William DP, Nicola A, Sam C, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Ishii T, McCouch SR. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 697–712.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research* **11**: 1441–1452.

Thompson JD, Higgins TJ, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.

Young ND, Tanksley SD. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **77**: 353–359.

Zeller FJ, Hsam SLK. 1996. Chromosomal location of a gene suppressing powdery mildew resistance genes *Pm8* and *Pm17* in common wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell.). *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 38–40.

Zhang QS, Lin C, Zhao CL, Wang CL, Yang WC, Zhou YL, Li DY, Chen CB, Zhu LH. 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.

Zhu L-H, Chen Y, Xu Y-B, Xu J-C, Cai H-W, Ling Z-Z. 1993. Construction of a molecular map of rice and gene mapping using a double haploid population of a cross between Indica and Japonica varieties. *Rice Genetics Newsletter* **10**: 132–135.

Supplementary Material

The following supplementary material is available for this article online:

Table S1 Marker used for genotyping and mapping of the introgression. Twenty-nine Simple Sequence Repeat (SSR) markers regularly distributed over the short arm of rice chromosome 8 and 7 SSR markers distributed on other chromosomes were chosen in the Gramene database (http://www.gramene.org/) (Chen *et al.*, 1997; Temnykh *et al.*, 2000, 2001; McCouch *et al.*, 2002). Seven additional SSR markers were designed close to the *Pi33* locus.

This material is available as part of the online article from: http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.2007.02105.x

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

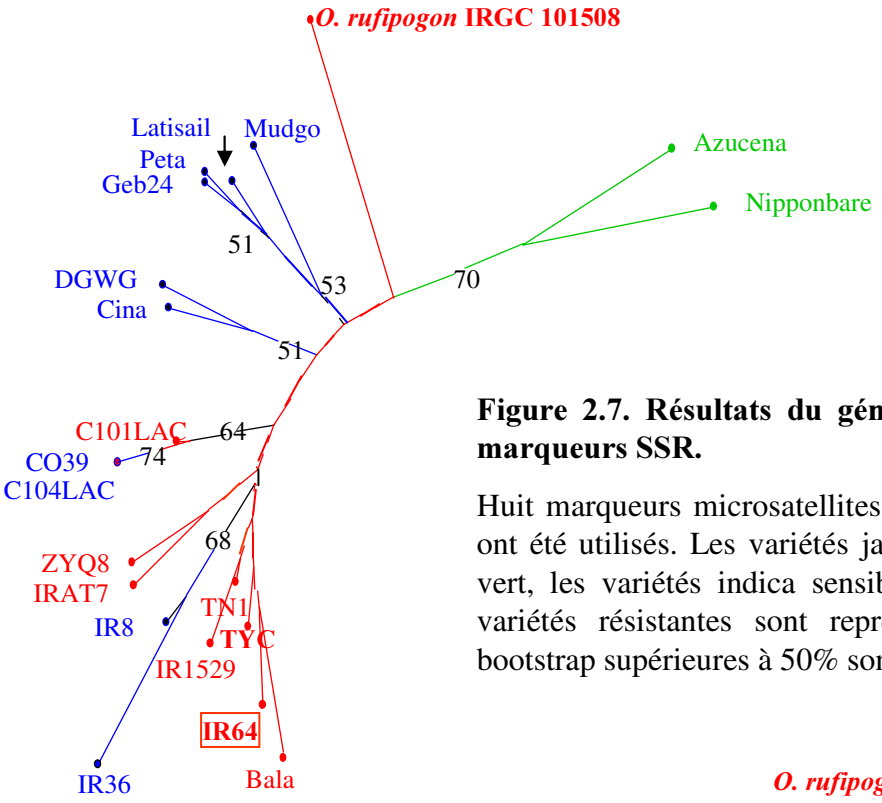


Figure 2.7. Résultats du génotypage de 21 variétés à l'aide de marqueurs SSR.

Huit marqueurs microsatellites répartis aléatoirement sur le génome ont été utilisés. Les variétés japonica sensibles sont représentées en vert, les variétés indica sensibles sont représentées en bleu et les variétés résistantes sont représentées en rouge. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont présentées aux nœuds.

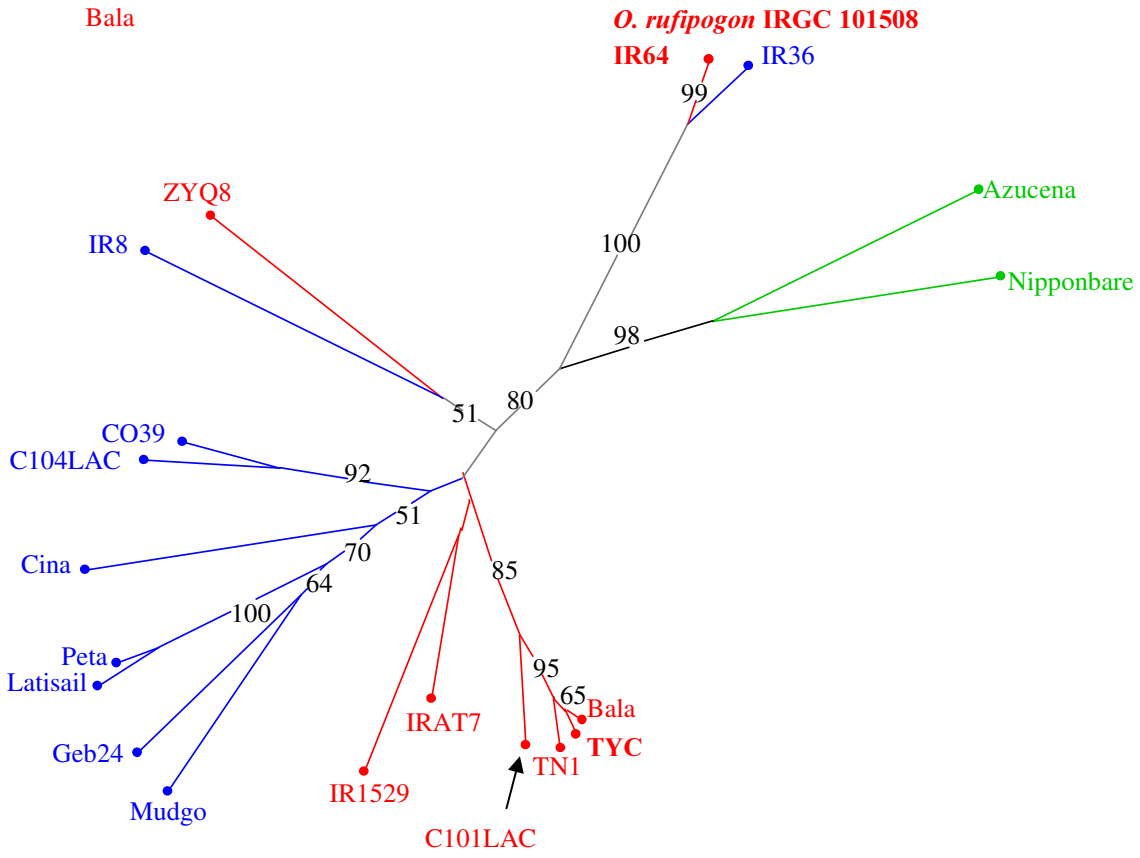


Figure 2.8. Résultats du génotypage de 20 variétés à l'aide de marqueurs SSR.

L'arbre a été construit à partir des résultats de génotypage sur 27 marqueurs microsatellites répartis entre RM3231 et RM3481 sur 5,3 Mbp du bras court du chromosome 8.

Les variétés japonica sensibles sont représentées en vert, les variétés indica sensibles sont représentées en bleu et les variétés résistantes sont représentées en rouge. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont présentées aux nœuds.

II.3 Distribution et Origine de Pi33

Notre objectif était tout d'abord de mettre en évidence les sources de résistance utilisées par les sélectionneurs pour incorporer *Pi33* dans les variétés modernes. Dans un second temps, notre objectif était de déterminer l'origine de *Pi33* et d'étudier la structuration du gène dans les deux principales sous-espèces de riz *Oryza sativa japonica* et *Oryza sativa indica* ainsi que dans quelques espèces de riz sauvages.

II.3.1 Résultats

a Sources de *Pi33* dans les variétés améliorées.

Le génotypage de 10 lignées au niveau du locus de *Pi33* a été complété avec des marqueurs microsatellites et comparé à un génotypage sur l'ensemble du génome. Ces résultats, corroborent l'origine multiple de *Pi33* (Ballini *et al.*, 2007) : une source « sauvage » avec l'accession *Oryza rufipogon* IRGC101508, une source indica avec la variété traditionnelle Tsai Yuan Chung (TYC) et probablement d'autres sources de types indicas qui n'ont pas pu être identifiées. Ces données ont été confirmées en utilisant un plus grand nombre de variétés qui ont également été génotypées au locus *Pi33* et sur l'ensemble du génome. Ces résultats sont présentés sous forme d'arbres (Figure 2.7 et Figure 2.8). L'arbre réalisé à partir des marqueurs répartis sur l'ensemble du génome reflète les données de structuration de l'espèce (Garris *et al.*, 2005) (Figure 2.7). Comme attendu, l'espèce sauvage *O. rufipogon* enracine l'arbre et les variétés de l'espèce *O. sativa* se répartissent selon les deux sous-espèces indica et japonica. Au sein du groupe indica deux groupes se détachent : un groupe de variétés traditionnelles (Mudgo à Cina) et un groupe de variétés modernes de type indica-demi nain (C101LAC à Bala). Par contre, lorsque les marqueurs situés sur le bras court du chromosome 8 autour du locus *Pi33* sont considérés, la structuration est différente (Figure 2.8). Les variétés résistantes se séparent en trois principaux groupes : l'haplotype *O. rufipogon* IRGC 101508, l'haplotype ZYQ8 et l'haplotype TYC. Au sein de l'haplotype TYC les valeurs de bootstrap permettent de distinguer plusieurs autres haplotypes : C101LAC et IR1529. Ce résultat confirme que TYC est le donneur de résistance pour les variétés Bala et TN1 qui possèdent toutes les deux TYC dans leurs généalogies. Par contre, ces résultats laissent penser que la source de la résistance pour les variétés ZYQ8, C101LAC et IR1529 pourrait être une autre variété que TYC, probablement de type indica.

L'utilisation de la source sauvage pour introgresser *Pi33* dans la variété IR64 a ensuite été confirmée par des marqueurs microsatellites situés sur le bras court du chromosome 8 autour du locus *Pi33* (Annexe 5). Ce génotypage met en évidence une introgression de 5,3 à 7,1 Mbp de

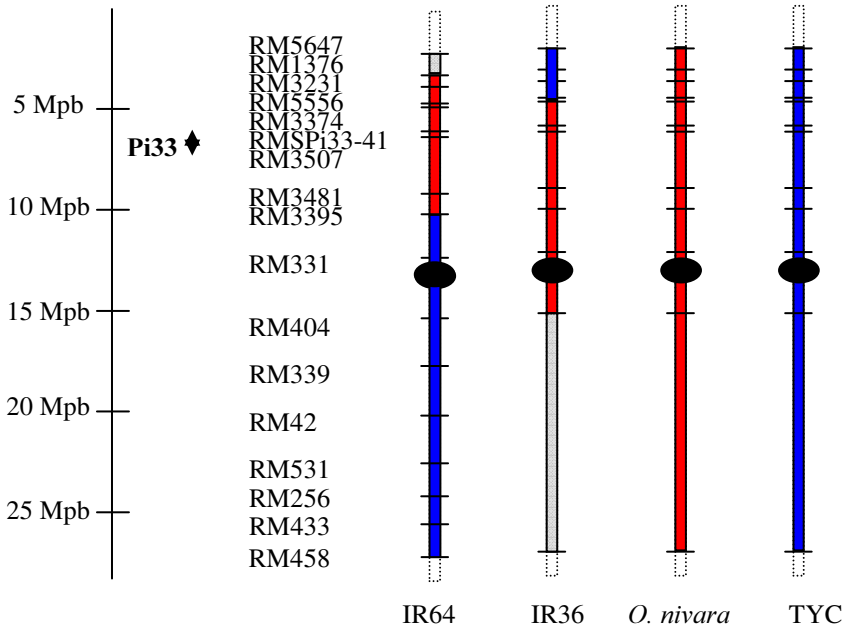


Figure 2.9. Origine du bras court du chromosome 8 dans quatre variétés de riz.
32 marqueurs microsatellites ont été testés entre RM5647 et RM458. La partie en blanc (télomère) n'a pas été génotypée. L'introgression de *O. rufipogon* est en rouge. En bleu introgression de TYC. En gris divers génotypes.

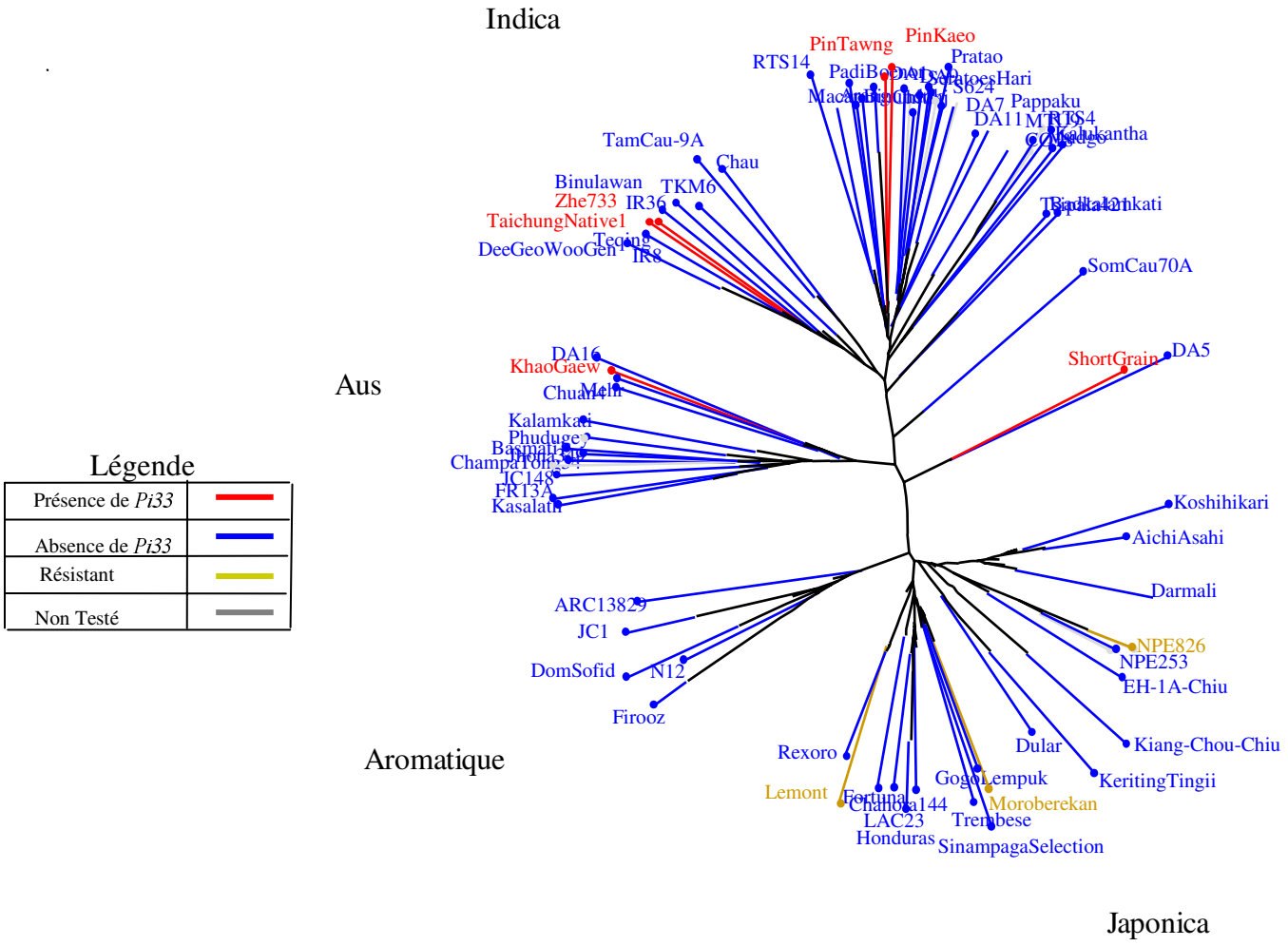


Figure 2.10. Arbre de répartition des données de la core-collection d'*Oryza sativa*.

Adapté de Garris *et al.* (2005).

l'accession de riz sauvage *O. rufipogon* IRGC101508 (Ballini *et al.*, 2007) chez la variété IR64 (Figure 2.9). Ainsi TYC ne serait pas la source de la résistance pour la variété IR64.

L'étude sur l'origine de *Pi33* dans la variété IR64 a révélé la présence de ce gène dans l'espèce sauvage *O. rufipogon*, considérée comme l'espèce ancestrale du riz cultivé *O sativa*. Ce résultat amène des questions sur l'origine «phylogénétique» de *Pi33*. Deux hypothèses peuvent être envisagées :

- le gène de résistance serait apparu chez l'espèce *O. sativa* et aurait été transféré à l'espèce sauvage lors d'allofécondations (phénomène connu entre ces deux espèces).
- ou *Pi33* aurait une origine relativement ancienne, et aurait été maintenu après la spéciation (1-2 millions d'années) et lors de la domestication.

Ce premier échantillon était relativement restreint (21 accessions) et ne comportait qu'une seule accession sauvage. Un échantillon plus large, comportant des variétés améliorées indica demi-naines mais aussi d'autres variétés notamment de type japonica, a donc été utilisé pour étudier la distribution de *Pi33* au sein des *Oryza sativa*. Cet échantillon a également servi à l'analyse de la distribution de *Pi33* au sein des espèces sauvages afin de corroborer nos hypothèses.

b <u>Distribution de *Pi33* au sein de l'espèce *Oryza sativa*</u>

Un échantillon de 211 variétés a été testé (Annexe 3). Cet échantillon a été construit afin d'être représentatif de la diversité de l'espèce. En effet, une partie de ces 211 lignées avait été génotypée à l'aide de marqueurs neutres répartis sur le génome (Garris et al., 2005) et ainsi classée dans les différents groupes de riz cultivés connus. Le critère de sélection de ces variétés s'appuie sur des données préliminaires (JL Notteghem, communication personnelle) selon lesquelles ces variétés seraient toutes sensibles vis-à-vis de la souche multi-virulente CM28. Nous disposons d'une souche isogénique de CM28 qui possède *ACE1*, ce qui permet de mettre en évidence un allèle de résistance de *Pi33* par un test de résistance. Afin de simplifier la rédaction, je parlerai dans ce paragraphe de fréquence de *Pi33* en sous entendant la fréquence de la reconnaissance de *ACE1* par un allèle de résistance de *Pi33*. Cette fréquence pourra alors regrouper différents allèles de *Pi33*. Pour les variétés préalablement génotypées avec des marqueurs neutres répartis sur le génome (Garris *et al.* 2005), les résultats sont présentés sous la forme d'un arbre (Figure 2.10). Cette figure, permet d'illustrer la répartition uniforme de notre échantillon au sein des cinq sous-groupes de riz cultivés. Seulement cinq variétés présentant un phénotype de résistance vis-à-vis d'*ACE1* ont été identifiées. Elles se répartissent entre les sous-espèces Aus et indica. Malgré, la pré-sélection de génotypes sensibles, trois variétés se sont avérées résistantes à la souche CM28. La détection de *Pi33* chez ces variétés n'a donc pas été possible. Cette différence est

Espèce	Sous-espèce	Génome	Résistant aux 2 souches	Présence de *Pi33*	Absence de *Pi33*	Total testé	Total exploitable	Fréquence *Pi33*
O. barthii		AA	5	1	1	7	2	50.0%
O. glaberrima		AA	9	0	24	33	24	0.0%
O. glumaepatula		AA	3	0	6	9	6	0.0%
O. granulata		AA	0	0	1	1	1	0.0%
O. longistaminata		AA	0	0	4	4	4	0.0%
O. meridionalis		AA	3	1	5	9	6	16.7%
O. rufipogon		AA	0	3	9	12	12	25.0%
O. sativa	Aus	AA	0	1	10	11	11	9.1%
O. sativa	Aromatic	AA	0	0	6	6	6	0.0%
O. sativa	Indica	AA	0	28	110	138	138	20.3%
O. sativa	Japonica	AA	0	0	48	51	48	0.0%
O. sativa	Indéterminé	AA	0	3	3	6	6	50.0%
O. punctata		BB	2	0	2	4	2	0.0%
O. eichingeri		BBCC	1	0	0	1	0	0.0%
O. minuta		BBCC	3	0	3	6	3	0.0%
O. punctata		BBCC	5	0	0	5	0	0.0%
O. collina		CC	1	0	0	1	0	0.0%
O. officinalis		CC	6	0	3	9	3	0.0%
O. alta		CCDD	1	0	0	1	0	0.0%
O. grandiglumis		CCDD	1	0	0	1	0	0.0%
O. latifolia		CCDD	7	4	2	13	6	66.7%
O. australiensis		EE	0	0	3	3	3	0.0%
O. brachyantha		FF	2	0	0	2	0	0.0%
O. ridleyi		HHJJ	0	0	1	1	1	0.0%
L. perrieri			1	0	0	1	0	0.0%
O. malampuzaensis			1	0	0	1	0	0.0%
Rhyncoryza subulata			0	0	1	1	1	0.0%
TOTAL			51	41	242	337	283	14.5%

Tableau 2.2. Résultats des tests de Résistance.

Les tests de résistance ont été évalués par inoculation de deux souches isogéniques de *M. oryzae* pour *ACE1*. Pour le protocole se référer à la Figure 28.

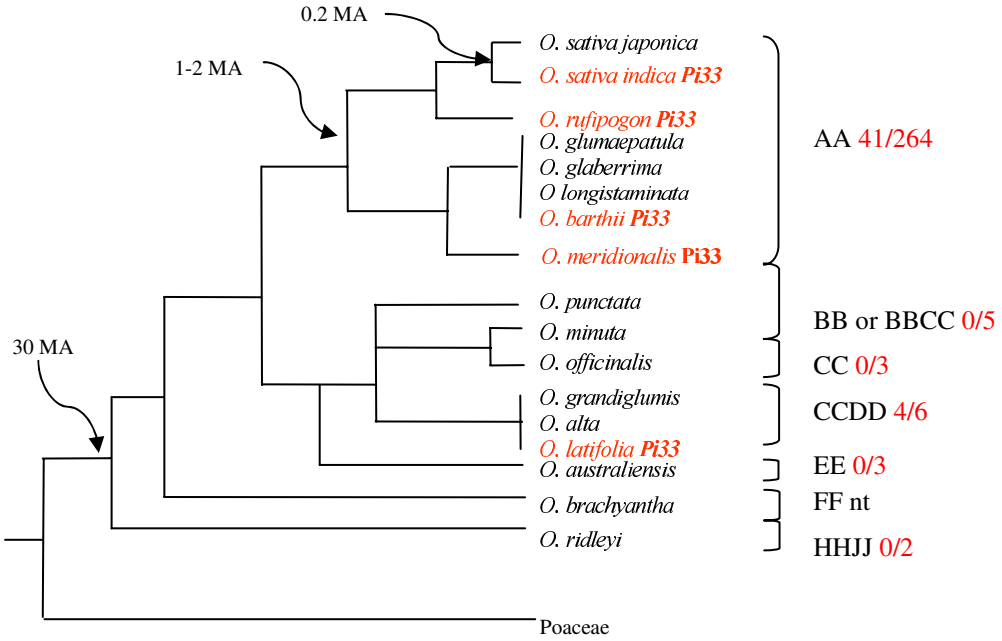


Figure 2.11. Distribution de *Pi33* au sein des espèces sauvages.

Arbre adapté de Ge *et al*., 1999. Les espèces présentant des variétés qui posséderaient *Pi33* sur la base des tests pathologiques sont en rouge. Les génomes des différentes espèces sont à droite. Le rapport à droite du génome représente le nombre de variétés possédant *Pi33* par rapport au nombre total de variétés testées exploitables.

probablement due à la différence de méthode d'inoculation employée (injection dans les premières expérimentations, pulvérisation dans les expérimentations récentes).

Au final, *Pi33* a été identifié chez 32 des 208 variétés, soit 16 % des accessions testées (Tableau 2.2). Cette fréquence est de 21.6 % pour les 139 accessions de la sous espèces indica. Dans l'hypothèse d'une expansion de *Pi33* lors de la Révolution verte, nous avons mesuré la fréquence de *Pi33* au sein de deux sous échantillons d'accessions indica : traditionnelles et améliorées. Ce second sous échantillon ne comprend probablement pas que des variétés issues de la Révolution verte mais est potentiellement enrichi par rapport au premier. La fréquence de *Pi33* est respectivement de 16.7 % (42 accessions traditionnelles testées) et 28.6 % (56 accessions améliorées testées). La fréquence élevée de *Pi33* dans les variétés améliorées s'explique en partie par le fait que notre échantillon comporte beaucoup d'accessions issues de la généalogie de la variété IR64. En effet, lorsqu'on retire les 10 accessions issues de croisements intermédiaires dans la généalogie d'IR64 la fréquence de *Pi33* est de 21.7%. Cette fréquence n'est pas significativement plus élevée que dans les variétés traditionnelles (Chi2, P=0,37). Il ne semble donc pas y avoir eu d'expansion de *Pi33* durant la révolution verte. La fréquence de *Pi33* est nulle dans l'échantillon de 44 variétés de la sous espèce japonica. *Pi33* semble donc être absent de la sous-espèce japonica, ce qui confirme les résultats préliminaires. L'autre sous espèces (Aus) est moins représentée et l'échantillon n'est donc pas représentatif. Sur les 11 Aus testés, *Pi33* a été détecté une fois (soit une fréquence de 9.1%).

c <u>Distribution de *Pi33* au sein des autres espèces du genre *Oryza*.</u>

Un échantillon de 125 accessions d'espèces sauvages a été testé (Annexe 4). Ces accessions sont issues de différentes collections, mais il ne s'agit pas d'une core-collection au sens strict car peu d'information sur leur diversité génétique est disponible. Néanmoins, cet échantillon est assez robuste car il comporte des accessions de 19 espèces sur les 23 connues ainsi que quelques accessions d'espèces proches du genre *Oryza* (*Leersia perrieri*, *Oryza malampuzaensis* et *Rhyncoryza subulata*).

Nous avons pu confirmer la présence de *Pi33* chez *O. rufipogon* dans 3 accessions sur 12 (25% ; Figure 2.11, 2.12 et 2.13 et Tableau 2.2). Parmi les 33 accessions de l'espèce cultivée, *O. glaberrima,* aucune ne présentait un allèle ayant la capacité de reconnaître le gène d'avirulence *ACE1*.

Pi33 n'a pas été détecté dans les génomes BB et CC. Mais, l'échantillon des accessions permettant la détection de *Pi33* a été limité du fait de difficulté à obtenir des semences en quantité suffisante et du fait d'une compatibilité plus réduite avec la souche virulente de *M. oryzae* utilisée. Pour les génomes BB et CC, 26 variétés testées, soit en moyenne 70 % des accessions,

A

B

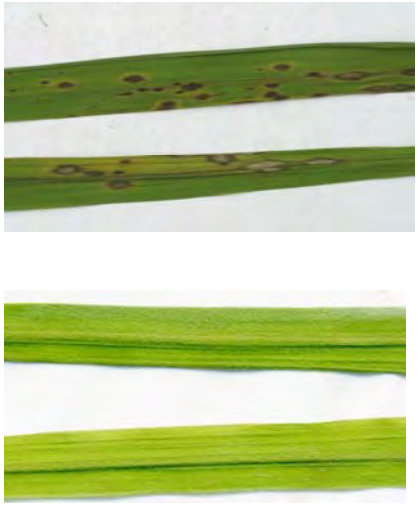


Figure 2.12. Symptômes sur *Oryza rufipogon* IRGC101508.

Symptômes sept jours après inoculation par pulvérisation avec l'isolat de *M. grisea* sauvage (A) et l'isolat complémenté avec l'allèle *ACE1* (B).

Figure 2.13. *Oryza rufipogon.*

Photo E. Ballini prise à la station expérimental Los Banos de l'IRRI (Philippines) avec rizière en arrière plan.

A

B

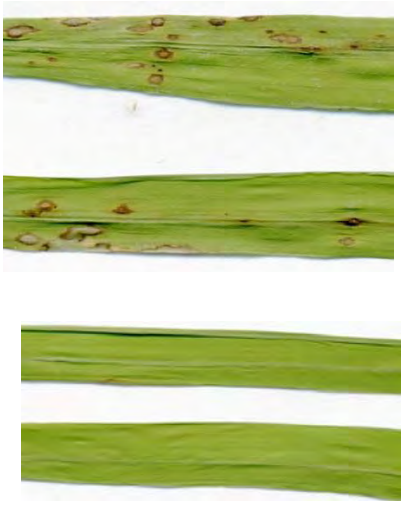


Figure 2.14. Symptômes sur *Oryza latifolia* W1184.

Symptômes sept jours après inoculation par pulvérisation avec l'isolat de *M. grisea* sauvage (A) et l'isolat complémenté avec l'allèle *ACE1* (B).

Figure 2.15 *Oryza latifolia* W1184.

Photo E. Ballini

étaient complètement résistantes aux deux souches isogéniques contre 27 % pour les 75 accessions testées de génome AA et 46 % pour les 24 accessions de génome plus éloignés (CCDD, EE, FF, HHJJ et autres). Les échantillons utilisables pour détecter *Pi33* sont donc très faibles pour la plupart des espèces, moins de 6 accessions en moyenne par espèce.

Par contre, en dépit de la taille limitée de notre échantillon, nous avons pu mettre en évidence *Pi33* chez six autres accessions correspondant à trois espèces : 1 accession de *O. barthii* (génome AA ; pour 2 accessions compatibles), 1 accession de *O. meridionalis* (génome AA ; pour 6 accessions compatibles) et quatre accessions de *O. latifolia* (génome CCDD ; pour 6 accessions compatibles) (Figure 2.11, 2.14 et 2.15 et Tableau 2.2). La présence de *Pi33* chez cette accession de riz sauvage tétraploïde est très surprenante et pourrait laisser supposer une origine très ancienne de *Pi33* (~20 MA), toutefois ce résultat mérite discussion.

II.3.2 Discussion

a <u>Plusieurs sources de résistance *Pi33* dans les variétés améliorées :</u>

Au moins deux sources de résistance ont été utilisées dans les croisements qui ont donné les variétés modernes de riz indica demi naines. L'une de ces sources est une variété traditionnelle, TYC, de type indica, l'autre est l'accession IRGC101508 de riz sauvage *O. rufipogon*. Ces deux sources présentent des haplotypes très différents au locus de *Pi33*. D'autres sources ont également pu être utilisées mais elles n'ont pas pu être identifiées.

Deux hypothèses permettent d'expliquer ces deux sources de résistance. Dans la première hypothèse, deux gènes différents au même locus reconnaîtraient le même gène d'avirulence. Le cas de deux gènes reconnaissant le même gène d'avirulence a été peu répertorié. *Rpm1* et *Rpg1-b* reconnaissent tous les deux le gène d'avirulence *AvrB* (Ashfield *et al.*, 2004). Ces deux gènes de résistance ont été clonés et ce sont deux gènes différents appartenant à deux espèces éloignées (arabidopsis et le soja). Dans le cas de *Cf2*, chez la tomate, un paralogue très similaire confère une résistance spécifique au même gène d'avirulence (Dixon *et al.*, 1996). Enfin, au locus *Xa21* chez le riz, le paralogue *Xa21D* confère une résistance partielle mais a le même spectre de résistance que *Xa21* (Wang *et al.*, 1998).

Dans la deuxième hypothèse, les différentes sources de résistance porteraient le même gène. Les haplotypes observés seraient soit un seul et même allèle dont les régions flanquantes auraient divergées, soit plusieurs allèles issus de différentes introgressions. En effet, le gène n'ayant pas été cloné, les haplotypes identifiés le sont sur la base de données de séquences et de marqueurs microsatellites situés dans une région de 240 kb autour de *Pi33*. Il est possible d'envisager que le gène soit très conservé bien que le reste du cluster soit très divergent. D'autre

part, l'hypothèse de plusieurs allèles différents est aussi envisageable. *Oryza rufipogon* et d'autres sources de résistances ont été utilisées par les sélectionneurs et ont pu chacune être introgressée, volontairement ou non. L'accession IRGC101508 a été utilisée dans la généalogie d'IR64 pour apporter la résistance au virus GSV et à son insecte vecteur *Nilaparvata lugens* (BPH). Bien que les sélectionneurs de l'IRRI testaient la résistance à *M. oryzae* dans leurs systèmes de sélection, l'introgression de *Pi33* n'a pas forcément été volontaire (Ballini *et al.*, 2007). Différents allèles de *Pi33* ont donc pu être introgressé à différentes reprises.

Dans le cas de *Pi33*, tant que le gène n'est pas cloné, il n'est pas possible de savoir si les sources de résistance observées correspondent à un même allèle, à différents allèles d'un même gène ou à deux gènes différents. D'autres méthodes pourraient être envisagées pour répondre à cette question comme la comparaison des spectres de résistance des différentes variétés. Cependant, ces variétés possèdant souvent plusieurs gènes de résistance, des tests d'allélisme (entre TYC et IR64 par exemple) pourraientt être envisagé pour pouvoir conclure. Il est important de préciser que ce genre d'analyse nécessiterait un nombre important de descendant afin d'obtenir des recombinants dans 240 kb. Dans l'optique de vérifier la présence des deux gènes au même locus, une cartographie génétique de *Pi33* pourrait être envisagée dans les différents fonds génétiques. *Pi33* a été cartographié au même locus dans les variété IR64 et Bala (Berruyer *et al.*, 2003). Bien que ce résultat aille dans le sens de l'hypothèse de l'allélisme des sources de résistance, une cartographie plus fine chez Bala serait nécessaire pour pouvoir conclure.

b Distribution de *Pi33* au sein des espèces cultivées et sauvages du genre *Oryza*

En dépit du fait que *Pi33* soit relativement fréquent chez les *Oryza sativa* avec une fréquence moyenne autour de 15% (une étude similaire chez *Arabidopsis* donnait une fréquence de 52 % pour *Rpm1* ; Stahl *et al.*, 1999) et qu'il soit présent chez des espèces du riz génétiquement très éloignées, le gène est absent de certaines espèces et sous-espèces. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la distribution de *Pi33* dans ces espèces : un problème d'échantillonnage, des phénomènes d'allofécondation dans le sens cultivé vers sauvage, une convergence évolutive, la présence de *Pi33* chez un ancêtre commun.

b.1 Un échantillonnage limité par le niveau de virulence des souches de M. oryzae

Une première explication à cette absence de *Pi33* chez certaines espèces est un problème d'échantillonnage. La difficulté d'obtenir des accessions et de les multiplier explique en partie la taille des échantillons de riz sauvages que nous avons pu tester. De plus, plusieurs des accessions testées se sont avérées résistantes aux deux couples de souches isogéniques utilisées et le test de

		Test de Résistance : *Pseudomonas* + *AvrPto*		
		Résistant	Sensible	Total
Test en transformation	HR = Allèle *Pto*+	13	2[a]	15
	Pas de HR = Allèle *Pto*-	3[b]	1	4
	Total	16	3	19

Tableau 2.3. Résultats des expériences de Rose *et al*., 2005.

19 variétés ont été testées lors de tests de résistance et de tests en transformation. a = Variétés pour lesquelles la cascade d'activation ne semble pas fonctionnelle. b = Variétés qui présentent une convergence évolutive pour la reconnaissance de *AvrPto*.

résistance n'a donc pas permis de déterminer la présence ou non de *Pi33* dans ces accessions. Plusieurs couples de souches isogéniques ont été testés, l'un obtenu avec la souche PH14 et l'autre avec la souche CM28. CM28 a un spectre de virulence large sur les variétés d'*O. sativa*. Mais de manière surprenante, cette souche est aussi compatible avec des accessions au génome très éloigné des riz cultivés : *Rhyncoryza subulata*, *O. ridleyi* (HHJJ), *O. australiensis* (EE) et *O. latifolia* (CCDD). Certaines accessions BBCC étaient elles aussi compatibles. Ce résultat démontre l'aptitude des souches pathogènes d'*O. sativa* à attaquer des espèces éloignées au sein du genre *Oryza*. La co-évolution entre le riz cultivé et *M. oryzae* n'a donc pas conduit à une spécialisation complète des souches de *M. oryzae*. Une spécialisation relative des souches est toutefois notable puisque 73% des 75 accessions à génome AA (autres qu'*O. sativa*) sont compatibles avec au moins une des souches testées contre 38% des 50 accessions n'appartenant pas au groupe AA.

b.2 Possibilité d'allofécondation entre espèces sauvages et cultivées

La présence de *Pi33* dans plusieurs accessions différentes et indépendantes d'espèces éloignées de riz sauvages, ainsi que sa fréquence relativement élevée chez *O. rufipogon* (25 %) tendrait à exclure l'hypothèse d'une allofécondation, ce phénomène étant connu mais assez peu fréquent (1,3 % d'hybrides jusqu'à 43 mètres de distance ; Song *et al.*, 2003) entre ces deux espèces. En outre, des séquences ont été obtenues à partir des ADN des accessions de génome AA. Leur fort taux de polymorphisme par rapport à la variété japonica Nipponbare est également en défaveur d'une allofécondation dans le sens indica vers sauvage (voir Chapitre 2 Tableau 3.2 pour le détail). De même, la présence de *Pi33* chez l'espèce *O. latifolia* (génome CCDD) ne semble pas imputable à des allofécondations avec *O. sativa* (génome AA). En effet, la fréquence élevée d'accessions d'*O latifolia* portant *Pi33* (66%) ainsi que leurs origines géographiques très éloignées (Chine, Mexique, Surinam et Argentine) sont en désaccord avec l'existence supposée de rares allofécondation entre les deux espèces (G Second, communication personnelle). Le fait que nous ayons différentes sources de graines devrait également exclure l'hypothèse d'allofécondations au sein d'une collection.

b.3 Une convergence évolutive à l'origine des reconnaissances d'ACE1 dans les espèces sauvages

Dans l'hypothèse d'une convergence évolutive, seul le clonage du gène chez ces variétés sauvages permettrait de conclure. Bien que peu de cas de convergence évolutive entre deux espèces très éloignées aient été rapportés (Ashfield *et al.*, 2004), cette hypothèse ne peut être écartée. Dans le pathosystème tomate/*P. syringae* deux gènes situés au même locus, *Pto* et *RsB,* reconnaissent le gène d'avirulence *AvrPtoB* (Abramovich *et al.*, 2003). *RsB* qui est plus fréquent chez les espèces sauvages serait également plus ancien (Martin *et al.*, 2007). Des tests de résistance

similaires ont été effectués sur différentes accessions d'espèces de tomate et ont permis de mettre en évidence des variétés cappable de reconnaître de manière spécifique *AvrPto* (Rose *et al.*, 2005). Cependant, les tests de transformation effectués à partir de l'allèle de *Pto* présent dans ces variétés n'ont pas toujours aboutis à un phénotype de HR (Tableau 2.3). Ce résultat implique qu'un autre gène que *Pto* reconnaît *AvrPto* de manière spécifique dans ces variétés.

b.4 Une origine ancienne de Pi33

Plusieurs éléments forts et convergents sont en faveur d'une origine ancienne de *Pi33* : sa fréquence élevée dans des espèces sauvages dont certaines très éloignées génétiquement et sa présence dans des espèces d'origines géographiques différentes. Notre étude aurait donc tendance à démonter que *Pi33* existait avant la spéciation des espèces du genre *Oryza*. Suivant cette hypothèse, *Pi33* serait âgé d'au moins 2 MA (si on ne considère que les espèces à génome AA) à 20 MA (si on considère que la présence de *Pi33* chez l'espèce *latifolia* n'est pas due à des allofécondations) (Salles Cortopassi *et al.*, Genome 2001). Un cas similaire de résistances présentes dans les variétés sauvages éloignées comme *O. latifolia* est documenté pour la résistance aux principaux biotypes de *N. lugens* (BPH) (Ikeda et Vaughan, 1991). Cependant, dans cette étude les biotypes correspondent à plusieurs gènes de résistance. Une origine ancienne des gènes de résistance n'a été démontrée que dans quelques autres cas. RPM1 aurait une origine ancienne, antérieure à la séparation des brassicaceae (Grant *et al.*, 1998). Le gène *Pto* daterait d'avant la séparation entre les espèces sauvages *L. hirsutum* et *L. pimpinellifolium* (Riely *et al.*, 2001). L'origine ancienne du gène LR10 a pu être évaluée chez le blé à au moins 2,4 MA (Isidore *et al.*, 2005). Chez Arabidopsis, la spécificité du gène RPW8 daterait de 10 à 15 MA, alors que la formation du cluster est daté par une première duplication de 23 à 35 MA (Xiao *et al.*, 2004).

Néanmoins, dans cette hypothèse d'une origine ancienne de *Pi33*, l'absence de *Pi33* chez deux des espèces (ou sous-espèce) domestiquées est également surprenante. Il est possible que le gène ait été présent au sein d'une variété ancestrale de l'espèce *O. sativa* puis perdu lors de goulots d'étranglement successifs subis par l'espèce (domestication, révolution verte). Le coût adaptatif demandé par la possession de ce gène dans l'environnement des japonicas aurait également pu causer sa perte. Le riz sauvage *O. rufipogon*, qui serait à l'origine du riz cultivé *O. sativa*, est lui-même déjà structuré en deux sous populations qui seraient à l'origine des indicas et des japonicas (Cheng *et al.*, 2003 ; Zhu et Ge, 2005 ; Londo et al 2006). Il aurait été intéressant de rechercher *Pi33* dans ces deux populations afin de vérifier notre seconde hypothèse. Lorsque nous avons initié ce travail, seule la publication de Cheng *et al.* (2003) était disponible. Nous avons tenté de récupérer et multiplier l'échantillon étudié mais seule une partie était accessible et toutes les accessions n'ont pas produit assez de semences pour être étudiées. Au final, seulement 5

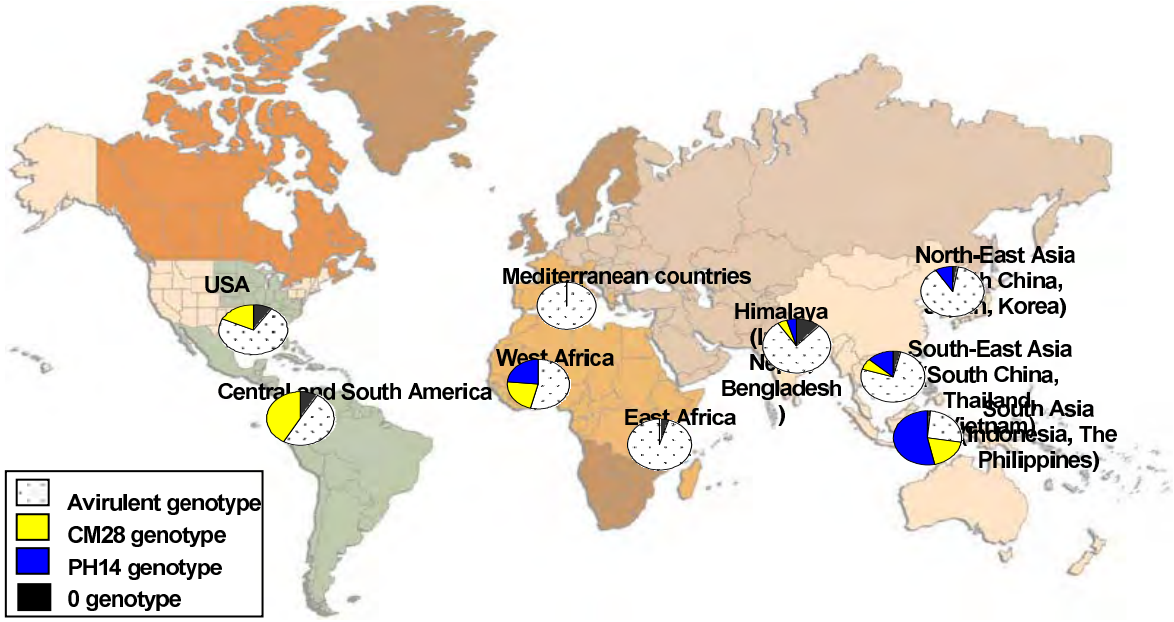


Figure 2.16. Distribution des différents allèles *ACE1* au niveau mondial.

Données fournies par D. Tharreau

accessions de cette étude ont pu être testées : 3 accessions dans le groupe « indica » (phylum II défini par Cheng *et al.*) dont 1 avec *Pi33* et 2 sans, et 2 accessions sensibles dans des groupes intermédiaires entre « japonica » et « indica » (phylum III et IV). Ce résultat ne contredit pas l'hypothèse de la présence de *Pi33* dans un seul groupe ancestral mais ne permet pas de conclure du fait de la taille limitée de l'échantillon. Les accessions issues des publications plus récentes (Zhu et Ge, 2005 ; Londo et al 2006) n'ont pas été testées.

Enfin, à partir des résultats préliminaires avait été émise l'hypothèse d'une amplification de *Pi33* chez les indicas demi-nains du fait de l'utilisation de la variété résistante TN1 pendant la révolution verte. La fréquence élevée de *Pi33* chez les variétés indicas traditionnelles ne confirme pas cette hypothèse et corroborerait l'hypothèse d'une origine ancienne de Pi33. En effet, le gène était déjà présent chez les indicas traditionnels d'origine géographiques différentes.

Si *Pi33* a une origine ancienne cela implique que sa co-évolution avec *Ace1* a été longue. Une autre manière de confirmer l'origine ancienne de *Pi33* pourrait donc être d'étudier l'origine d'*Ace1* et sa distribution géographique. Cette étude est menée par notre laboratoire en collaboration avec le laboratoire de MH Lebrun qui a cloné *Ace1*.

c <u>Une co-évolution ancienne entre *ACE1* et *Pi33* ?</u>

L'étude de la diversité du gène d'avirulence *Ace1* a permis d'identifier trois génotypes pour les souches virulentes (Couch *et al.* 2005 ; I Fudal, D Tharreau, MH Lebrun en préparation). L'étude de ces génotypes laisse supposer que les deux génotypes majoritaires sont issus d'un évènement complexe et unique. La distribution mondiale observée actuellement serait le résultat de la dispersion à longue distance de ces génotypes, probablement en même temps que la propagation des variétés cultivées possédant *Pi33* lors de la révolution verte (Figure 2.16). Dans ce cas, la dispersion des souches virulentes serait récente (50 ans) mais aucune datation de son apparition n'est possible en l'absence de données fossiles. Le fait que peu de génotypes virulents soient observés pourrait s'expliquer par une pression de sélection faible sur l'agent pathogène. En conséquence, il y aurait eu peu d'évènements d'apparition de souches virulentes. Une autre explication peut être déduite de la distribution actuelle des génotypes. Il y aurait eu un fort goulot d'étranglement au moment de la propagation des génotypes suivi d'une expansion géographique. Ce goulot d'étranglement pourrait expliquer le faible nombre d'allèles observés. De plus, ces évènements récents masqueraient la co-évolution ancienne entre *ACE1* et *Pi33*.

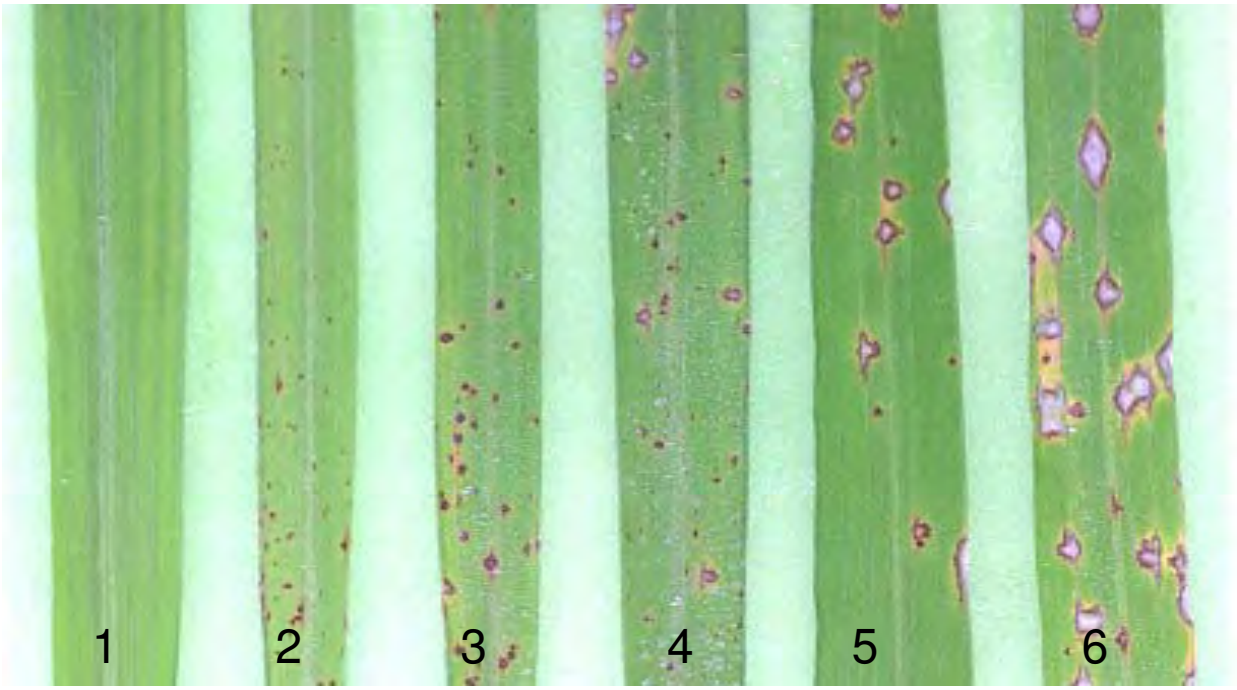


Figure 2.17 : Échelle de notation.

D'après Notteghem (1981). Les plantes présentant des symptômes 1 et 2 sont considérées comme résistantes. Les plantes présentant des symptômes 5 et 6 sont considérées comme sensibles. Les plantes présentant des symptômes 3 et 4 sont considérées comme partiellement sensibles.

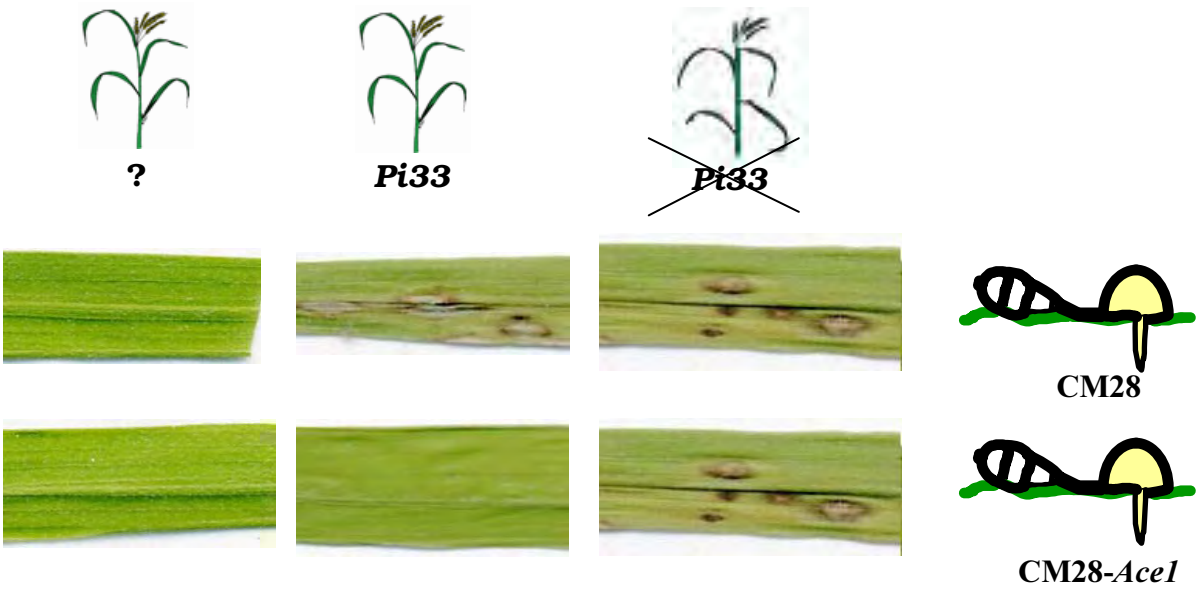


Figure 2.18. Exemples de résultats issus des tests de résistance.

Pour détecter la présence de *Pi33* dans une variété, les deux souches isogéniques sont inoculées en parallèle sur deux répétitions de semis. Le gène est considéré comme étant présent si la variété est résistante à la souche CM28-31C12 (transformée avec *ACE1*) et sensible à la souche sauvage CM28.

II.4 Matériels et Méthodes

II.4.1 Matériel fongique et inoculation

La détection d'un allèle résistant du gène *Pi33* repose sur l'utilisation de couples de souches isogéniques pour l'allèle avirulent du gène *ACE1*. Ces souches ont été obtenues par complémentation (Böhnert *et al.*, 2001) et *ACE1* est suffisant pour complémenter les souches virulentes de *M. oryzae*. Quatre souches virulentes ont été ainsi complémentées par l'équipe de M-H Lebrun dont certaines (CM28, 2/0/3) présentent un spectre de virulence relativement large.

Les souches de *M. oryzae* sont cultivées 10 jours sur milieu farine de riz, (annexe 1) à 28°C, avec une alternance de lumière et d'obscurité de 12h/12h. Les boîtes sont scellées afin de limiter l'évaporation. Les spores sont prélevées et les suspensions de spores calibrées par comptage sur cellule de numération. Les plantes sont inoculées 20 à 30 jours après semis (stade 3-4 feuilles) par pulvérisation d'une suspension de 50 000 spores/mL dans une solution à 0.5 % de gélatine. La lecture des symptômes se fait sept jours après l'inoculation. Des notes de 1 à 6 sont attribuées aux symptômes à l'aide d'une échelle dérivée de celle de Notteghem (1981) (Figure 2.17). L'interprétation de la présence de *Pi33* se fait en suivant la théorie gène pour gène de Flor (1973). Une variété sensible à l'isolat sauvage mais résistante à ce même isolat complémenté avec *ACE1* est considérée comme porteuse d'un allèle de résistance de *Pi33* (Figure 2.18).

II.4.2 Matériel végétal et culture

Les variétés sélectionnées pour le premier échantillon ont été criblées au sein d'une core-collection représentative de la diversité d'*O. sativa* appelée mini Germplasm Bank (Glaszmann, 1987 ; Garris et al., 2005). Cet échantillon (Annexe 3) a été enrichi avec des variétés issues de notre propre collection, notamment avec des variétés d'intérêt agronomique ou scientifique comme IR64, Bala et ZYQ8. Nous disposons également de deux variétés isogéniques C101Lac et C104Lac, la première ayant les gènes de résistance *Pi1* et *Pi33*, la seconde *Pi1* (Mackill et al., 1992 ; Berruyer *et al.*, 2003). Ainsi, nous avons effectué des tests pathologiques sur 211 variétés de riz de l'espèce *O. sativa*. Un deuxième échantillon a été constitué à partir d'une collection d'espèces sauvages de riz en provenance du Japon (National Institute of Genetics, Japon ; http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp), et d'accessions de collections fournies par G. Second (IRD) et O. Panaud (Université de Perpignan). Ce deuxième échantillon (Annexe 4) rassemble 128 accessions de 24 espèces différentes.

Les lignées de riz sont cultivées dans un mélange de terreau et de pouzzolane (détail de la conduite de culture dans l'annexe 2). Les semis sont réalisés dans des terrines de semis de 30 × 50

× 7 cm à raison de 16 lignes de grains et de 15 grains par ligne. Dans le cas des graines d'espèces sauvages, le semis est précédé d'une étape de levée de dormance par traitement thermique (52°C pendant 72h) et d'une pré-germination (3 jours à 28°C 100% d'humidité).

II.4.3 Données moléculaires

Pour identifier le ou les donneurs de *Pi33*, une partie des variétés ayant *Pi33* a été génotypée à l'aide de marqueurs microsatellites (SSR). L'ADN de ces différentes variétés a été extrait selon le protocole standard décrit dans Berruyer et al. (2003). Sept marqueurs SSR répartis aléatoirement sur le génome et sept marqueurs situés à proximité de *Pi33* ont été sélectionnés (Annexe 9) pour leur polymorphisme important entre les sous espèces indica et japonica. Le protocole d'amplification est décrit dans l'annexe 10. Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3% (2.5 h à 100 V). Les différentes tailles observées ont été codées en un numéro représentant chaque allèle. Ces données ont été analysées avec le logiciel DARWIN 4.0 (Perrier *et al.*, 2003; Perrier & Jacquemoud-Collet, 2005). Les similarités entre variétés ont été calculées en utilisant la distance de Sokal et Michener (Sokal et Michener, 1958). Un dendrogramme a ensuite été construit par neighbour joining avec calcul de valeurs de bootstrap (10 000 itérations).

III Chapitre 2

Cartographie et Clonage de Pi33

Photo : Plantes in vitro (Elsa Ballini)

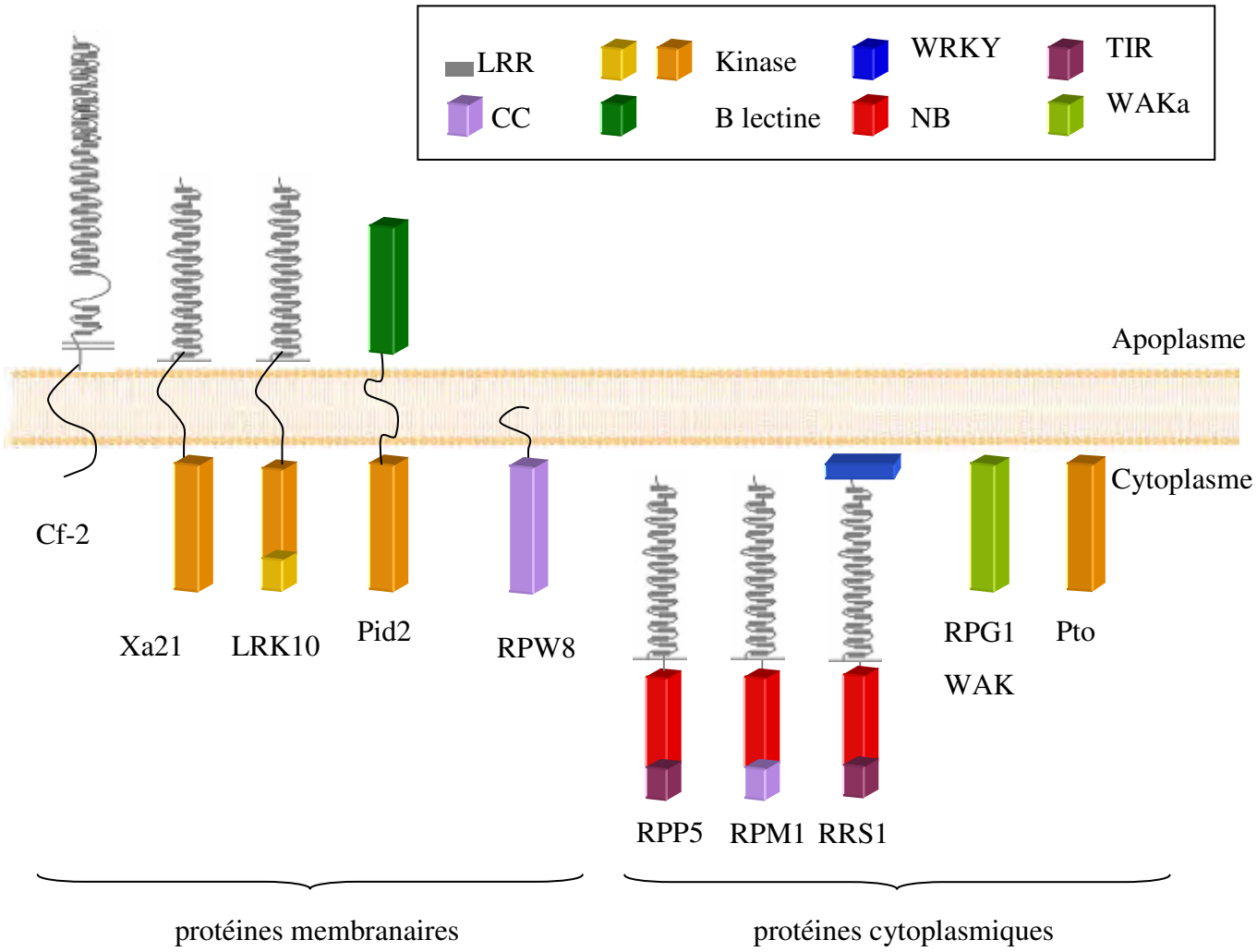


Figure 3.1. Les grandes classes de protéines codées par les gènes de résistance des plantes.
Les 10 types de gènes de résistance clonés sont représentés. Ils peuvent être répartis en deux grandes classes : protéines membranaires avec domaine extracellulaire et protéines cytoplasmiques. Les gènes sont cités à titre d'exemple et la liste n'est pas exhaustive.

III.1 Introduction :

III.1.1 Les gènes de résistance : structure, fonction et organisation génomique

a Les différents types de gènes de résistance

Une cinquantaine de gènes de résistance a déjà été clonée (Martin *et al.*, 2003). Deux grands types de gènes de résistance peuvent être identifiés en fonction de la localisation cellulaire de leurs produits (Holub, 2001 ; Dangl et Jones, 2001 ; Nimchuk *et al.*, 2003) (Figure 3.1) : les protéines membranaires et les protéines cytoplasmiques. Cette séparation se fait sur la base de la présence ou non d'un domaine transmembranaire (TM) au sein de la protéine. Les protéines membranaires pourraient reconnaître plutôt des effecteurs pathogènes extra-cellulaires (dans l'apoplasme) alors que les protéines cytoplasmiques reconnaîtraient des effecteurs pathogènes intra-cellulaires.

a.1 Les récepteurs membranaires

Toutes ces protéines présentent un motif transmembranaire (TM) hydrophobe qui ancre la protéine dans la membrane cytoplasmique. Ensuite, plusieurs variations sont possibles. Les protéines peuvent présenter ou non un domaine extracellulaire, souvent de type LRR (Leucine Rich Repeat) et un domaine intracellulaire. Actuellement, sept protéines de résistance de ce type sont décrites.

Les gènes *Cf2*, *Cf4*, *Cf5* et *Cf9* de l'interaction tomate/*Cladosporium fulvum,* (De Wit et Joosten, 1999) représentent un premier type de gène qui a la particularité de ne pas posséder de domaine intracellulaire. Dans le cas de *Cf2* et *Cf4*, le domaine **LRR extracellulaire** interagirait avec une protéine gardée extracellulaire (Rooney *et al.*, 2005 ; Gabriëls *et al.*, 2007). En effet, la protéine Cf2 de tomate garde la cystéine protéase extracellulaire Rcr3. Avr2, produite par *C. fulvum*, est une protéine inhibitrice des cystéine protéases qui empêche le bon fonctionnement de Rcr3. Cf2 reconnaît les changements de conformation de Rcr3 provoqués par la formation du complexe Avr2-Rcr3.

Les récepteurs membranaires les plus courants sont du type **Récepteur-Kinase** et présentent un domaine kinase intracellulaire. Plus de 1 000 membres de cette famille de gènes ont été identifiés chez le riz. Les récepteurs-kinases ont été séparés en deux classes, sur la base de la présence (ou de l'absence) de deux acides aminés (une Arginine R et un Aspartate D) situés dans le sous domaine VI de la kinase (Dardick *et al.*, 2006). Ces deux classes sont appelées respectivement « Kinases-RD » et « Kinases-non RD ». Dardick et al. (2006) montrent que toutes

les kinases qui interagissent avec un agent pathogène, qu'elles soient d'origine animale ou végétale, sont de type « Kinase-non RD ». Au sein de la classe des récepteur-kinases, on peut distinguer la classe des **LRR-kinases** qui comporte environ 400 membres, séparés en 13 sous-familles en fonction des relations phylogénétiques dans la séquence du domaine kinase (Dievart *et al.*, 2003 ; Dardick *et al.*, 2006). Bien que la fonction de ces gènes ne soit pas connue pour la plupart, parmi les sous-familles, deux de type « Kinases-non RD » semblent impliquées dans les interactions plantes-agents pathogènes : la sous famille **LRR-XII** et la sous famille **LRK10L-2**. La sous famille LRR-XII est représentée par les gènes *Xa21* et *Xa26* impliqués dans l'interaction riz/*Xanthomonas oryzae* (Song *et al.*, 1995 ; Sun *et al.*, 2004). La sous famille LRK10L-2 est représentée par le gène *LRK10* initialement décrit comme étant impliqué dans l'interaction blé/*Puccinia triticina* (Feuillet *et al.*, 1997). Cependant, l'implication de ce gènes dans cette interaction n'a pas été confirmée (Feuillet *et al.*, 2003). Une autre classe de Récepteur-kinases, « Kinases-non RD », est représentée par le gène *Pid2* de l'interaction riz/*Magnaporthe oryzae* (Chen *et al.*, 2006). Cette classe de gènes de résistance présente un domaine **ß-Lectine extracellulaire** au lieu du domaine LRR. Pour l'instant aucune donnée ne permet de connaître le fonctionnement de ces récepteur-kinases, mais le domaine extracellulaire pourrait être impliqué dans la reconnaissance à la manière des protéines Cf et le domaine kinase pourrait être impliqué dans la transduction du signal.

Enfin, trois autres gènes à la structure plus originale peuvent être cités : ***HS1PRO1*** présente un domaine transmembranaire et un motif n'ayant qu'une légère homologie avec des LRR (Cai *et al.*, 1997) ; ***Rpw8*** présente un domaine Coiled-Coil (CC) mais le reste de la protéine ne présente pas d'homologie avec des gènes dont le rôle est connu (Xiao *et al.*, 2001). Le gène récessif ***mlo***, code pour une petite protéine transmembranaire dont la fonction reste inconnue (Buschges *et al.*, 1997). La protéine Mlo serait un inhibiteur du système de défense basal et/ou serait une cible pour un effecteur du champignon. En particulier, la calmoduline interagirait avec Mlo pour moduler les réactions de défense (Kim et al., 2002 ; Bhat et al., 2005). Le mutant récessif *mlo* correspondrait à une perte de fonction et permettrait une activation plus précoce du système de défense.

a.2 Les protéines de résistance cytoplasmiques

Ces protéines de résistance ne présentent pas de domaine extracellulaire mais elles pourraient être liées à la membrane au sein d'un complexe avec d'autres protéines, elles pourraient également être nucléaires à certaines phases de l'interaction (Shen *et al.*, 2007). Parmi ces protéines de résistance certaines présentent un domaine kinase comme certaines des protéines de résistance membranaires décrites ci-dessus. Les autres présentent en général un domaine LRR

différent du domaine LRR extracellulaire (Kajava, 1998) et un domaine NB-ARC (Nucleotide Binding commun à *APAF1*, gènes R et *CED4* ; van der Biezen et Jones, 1998).

Les protéines les plus courantes sont les **NB-ARC-LRR** appelées également **NBS-LRR**. Cette famille est de loin la famille de gènes de résistance la plus représentée avec plus de 400 membres chez le riz (Monosi *et al.*, 2004). En plus des domaines NBS (Nucleotide Binding Site), ARC et LRR, elles présentent un domaine N-terminal qui peut être de différents types : Coiled Coil (CC) ou Leucine Zipper (ZP), Toll-Interleukine (TIR) ou autre. Plusieurs NBS-LRR ont été clonés dont *Prf* dans l'interaction tomate/*P. syringae*, *RPM1*, *RPS2* et *RPS4* dans l'interaction Arabidopsis/*P. syringae* (Grant *et al.*, 1995), *RPP8* et *RPP13* dans l'interaction Arabidopsis/*Peronospora parasitica*, *Pib*, *Pita*, *Pi2*, *Pi9*, *Pi36*, *Pi37* dans l'interaction riz/*M. oryzae* (Liu *et al.*, 2007) et, plus récemment, *Lr1* dans l'interaction Blé/*Puccinia triticina* (Cloutier *et al.*, 2007). De manière surprenante, il n'existe aucune TIR-NB-ARC-LRR chez les poacée alors que cette famille est très répandue chez les dicotylédones (Bai *et al.*, 2002 ; Pan et al., 2000). Des représentants de cette famille sont les gènes *L* de l'interaction lin/*Melampsora lini* (Lawrence *et al.*, 1995), *RPP1*, *RPP2* et *RPP5* dans l'interaction Arabidopsis/*P. parasitica*. La protéine codée par le gène *RRS1R* de l'interaction Arabidopsis/*Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2002) présente la particularité d'avoir en plus un domaine WRKY (facteur de transcription) en N-terminal.

Certaines protéines de résistance cytoplasmiques ne présentent pas de domaine LRR mais simplement une **kinase** cytoplasmique. Ainsi, le premier gène de résistance à avoir été cloné, le gène *Pto* de l'interaction tomate/*Pseudomonas syringae*, présente uniquement un domaine kinase intracellulaire (Martin *et al.*, 1993). Dans le cas de *Pto*, une interaction directe avec le ligand AvrPto a pu être démontrée malgré l'absence d'un domaine LRR (Tang *et al.*, 1996). De même, le gène *RPG1* de l'interaction orge/*Puccinia graminis* (Brueggeman *et al.*, 2002) ne présente pas de domaine LRR mais un domaine kinase de type **WAK** (Wall Associated Kinase) intracellulaire.

b La fonction des différents domaines des gènes de résistance

La fonction des différents domaines des gènes de résistance n'a pas été complètement démontrée chez tous les gènes de résistance, mais des données existent pour certains d'entre eux (Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Nimchuk *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2003). Un gène de résistance classique doit jouer un rôle dans la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène puis stimuler le déclenchement du système de défense et, en particulier, la réponse hypersensible (HR). Ce phénotype de mort cellulaire étant toxique pour la plante en l'absence d'agent pathogène, les gènes de résistance subissent également une régulation qui peut être interne ou externe.

- *Reconnaissance de l'agent pathogène*

En cas de reconnaissance directe de l'agent pathogène, certains domaines des gènes de résistance doivent être impliqués dans cette reconnaissance. Dans le cas du gène *Pita* de l'interaction riz/*M. oryzae,* le domaine LRR a été démontré comme interagissant directement avec le produit du gène d'avirulence de l'agent pathogène (Jia *et al.*, 2000). Le domaine LRR est un domaine conservé qui existe également chez les animaux, chez qui un rôle dans la reconnaissance d'autres protéines est plus documenté (Kobe *et al.*, 1994 ; Medzhitov *et al.*, 2000). Un autre argument en faveur du rôle du domaine LRR dans la reconnaissance est sa grande diversité allélique qui jouerait un rôle dans la spécificité des gènes de résistance (Kobe et Diessenhofer, 1995 ; Dodds *et al.*, 2006). Ainsi, chez le riz, la différence de spécificité entre les allèles *Pi2* et *Piz*t est due à seulement huit acides aminés, situés dans le domaine LRR (Zhou et al., 2006).

Le domaine LRR est donc souvent considéré comme le principal domaine conférant la spécificité. Cependant, d'autres domaines ont également un rôle dans la spécificité comme le domaine TIR (Luck *et al.*, 2000). Ainsi, le domaine TIR du gène N du tabac, s'associe à la protéine p50 pour permettre la reconnaissance de l'agent pathogène (Burch-Smith *et al.*, 2007).

- *Transduction du signal*

Le domaine NBS pourrait être impliqué dans la transduction du signal. Ce domaine est très similaire au domaine NACHT des gènes NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) des mammifères qui a un rôle dans la réponse immunitaire. Cependant, cette similarité serait probablement due à une convergence évolutive (Ausubel, 2005). A la manière du domaine NACHT des mammifères, le domaine NBS permettrait l'accrochage et l'hydrolyse de l'ATP (Tameling *et al.*, 2002 ; Tameling *et al.*, 2006). L'hydrolyse de l'ATP provoquerait un changement conformationnel qui permettrait la transduction du signal.

Chez les animaux le domaine N-terminal TIR est impliqué dans la transduction du signal. De plus, des comparaisons au sein des domaines TIR d'une part (Meyers *et al.*, 2002) et au sein des domaines CC d'autre part (Meyers *et al.*, 2003) ont mis en évidence des motifs conservés qui pourraient être le signe d'une implication dans une voie de transduction commune. Dans le cas du gène *Rx* de l'interaction pomme de terre/PVX, l'interaction entre le domaine N terminal et la protéine RanGAP2 est nécessaire pour une résistance forte à PVX (Tameling et Baulcombe, 2007). Le domaine CC a un rôle dans l'interaction avec d'autres protéines ce qui peut laisser supposer qu'il joue un rôle dans le complexe protéique dont font partie les NBS-LRR et donc, éventuellement, dans la transduction du signal. Ainsi, le domaine CC a été démontré à plusieurs reprises comme interagissant avec une protéine gardée par le gène de résistance : RPS5 interagit avec le produit du gène *PBS1* (Ade *et al.*, 2007) ; PRF interagit avec PTO (Mucyn *et al.*, 2006) et RPM1 interagit avec RIN4 (Mackey *et al.*, 2002). Plus récemment, une interaction entre le

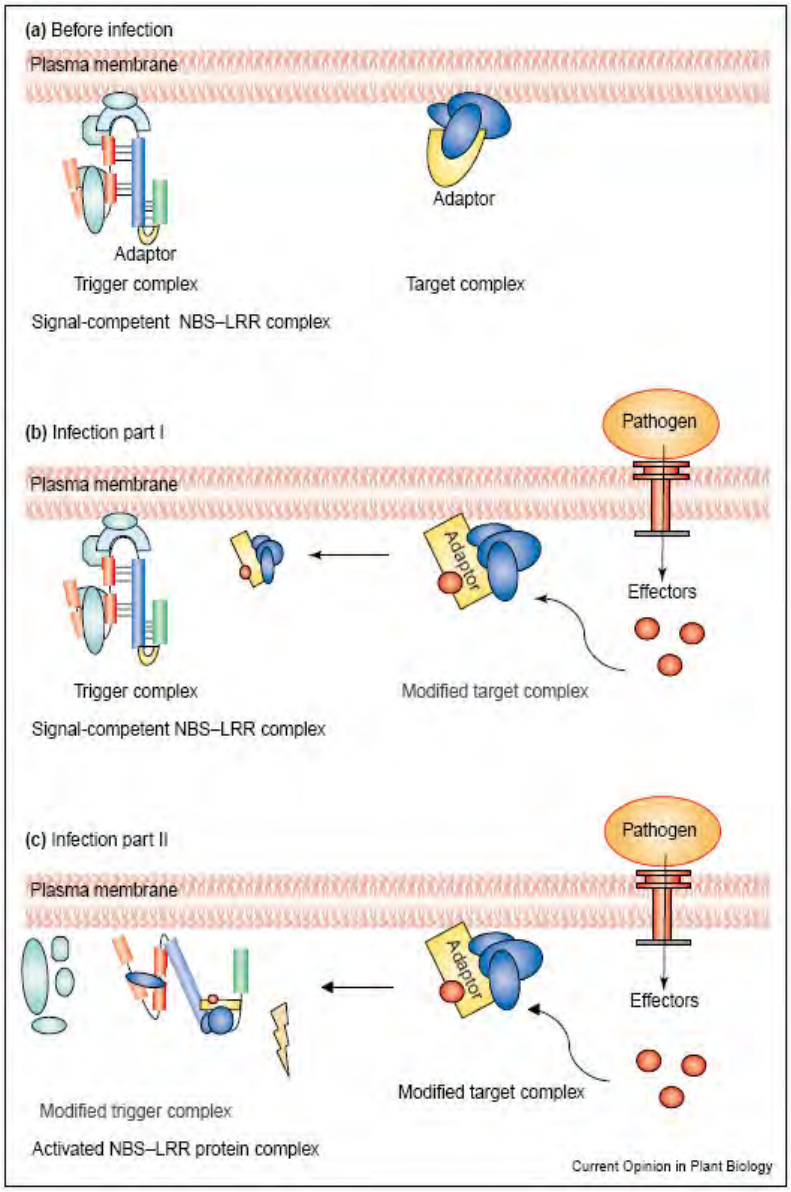


Figure 3.2. Modèle d'activation des NBS–LRR.
D'après Belkhadir *et al*., 2004
(a) Deux complexes protéiques différents sont présents au niveau de la membrane plasmique : le complexe « trigger » (= déclencheur) qui contient une NBS–LRR associée avec un adapteur (jaune) et une protéine de régulation (bleue) qui ensemble la régulent négativement.
(b) Après l'infection, les effecteurs (rouges) s'associent avec leur cible et modifient la protéine adaptatrice. Ce complexe interagit ensuite avec le complexe « trigger » (= déclencheur) .
(c) Ainsi les régulateurs de la NBS-LRR subissent des changements conformationnels et la NBS-LRR est activée.

domaine CC et des facteurs de transcription de type WRKY a été démontrée (Shen *et al.*, 2007). Les domaines Leucine Zipper et TIR pourraient faciliter la dimérisation de la protéine avec elle-même ou avec une autre protéine (Mestre et Baulcombe, 2006) et pourraient donc aussi interagir avec des régulateurs ou une protéine gardée.

Les kinases sont nécessaires lors de nombreuses étapes de la vie de la plante, pour les communications cellulaires (Morris et Walker, 2003), pour la régulation du développement (Dievart *et al.*, 2004), pour la physiologie et bien sûr pour la défense. Elles pourraient jouer un rôle comme activateur de facteurs de transcription. Ainsi, PTO interagit avec de nombreuses autres protéines dont certaines kinases comme PTI1 (Zhou *et al.*, 1995).

Enfin, le domaine LRR pourrait également jouer un rôle dans la transduction du signal. Dans le cadre de l'interaction orge/*Blumeria graminis* des mutations situées dans le domaine LRR du gène *Mla* altèrent la voie de signalisation par la protéine RAR1 (Halterman et Wise, 2004). De même pour les gènes *RPS5* et *Mi*, des mutations dans le domaine LRR compromettent la résistance et pourraient être liées à la transduction du signal (Warren *et al.*, 1998 ; Hwang *et al.*, 2000).

- *Régulation*

Un modèle de régulation des NBS-LRR, à la fois interne et en trans, a été décrit par Belkhadir *et al.* (2004) et est repris dans la Figure 3.2. En effet, les gènes de résistance déclenchant des phénotypes de type mort cellulaire (HR), il est essentiel pour la plante de réguler l'activation des gènes de résistance et de détruire rapidement les produits de ces gènes.

Les gènes de type NBS-LRR seraient régulés négativement de manière interne (Rathjen et Moffett, 2003). Le domaine LRR pourrait avoir un rôle dans la régulation interne de la protéine de résistance. Ainsi, le domaine LRR de la protéine codée par le gène *Rx* de la pomme de terre interagit avec le domaine ARC. Le domaine ARC, est un domaine composé de deux unités, situées entre les domaines NB et LRR. Il est souvent considéré comme faisant partie du domaine NBS. Le fait que certaines mutations au sein du domaine LRR aboutissent à une sur-activation du gène de résistance, laisse penser que l'interaction entre les domaines LRR et ARC régulerait négativement la protéine de résistance. Cette interaction est interrompue par la présence du virus PVX (Rairdan et Moffett., 2006). Des résultats similaires ont été obtenus pour le gène *RPS5* d'Arabidopsis (Ade *et al.*, 2007).

Des régulateurs en trans devraient également intervenir puisque certains gènes de résistance, lorsqu'ils sont surexprimés, entraînent une HR même en l'absence de l'agent pathogène. Ainsi, dans le cas du gène *Rps2,* la surexpression des domaines N-terminal et NBS suffit pour provoquer une HR (Tao *et al.*, 2000). Le gène *Pto* de la tomate serait un régulateur de

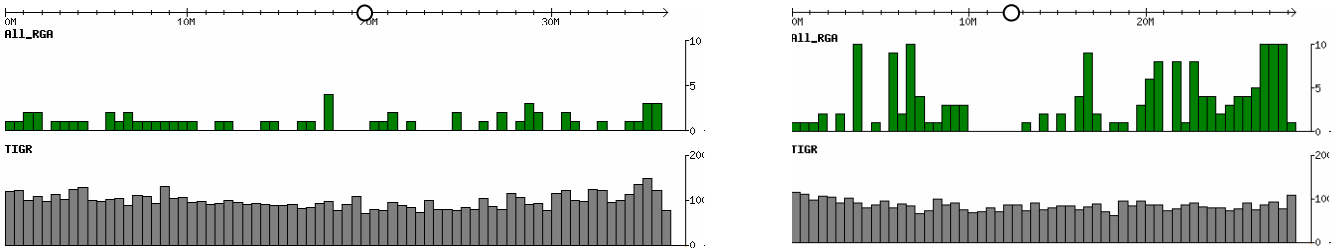


Figure 3.3. Répartition des RGA sur deux chromosomes du Riz.

Le chromosome 3 présente une densité faible en RGA alors que le chromosome 11 est très dense. La densité en RGA est représentée en vert. Elle a été calculée à partir de la position de 1 045 RGA disponible sur la base de données OrygenesDB avec une fenêtre de 500 kb. Le cercle blanc représente la position du centromère. La densité en gènes (prédiction automatique TIGR) est présentée en dessous en gris (90 gènes pour 500 kb en moyenne).

Gène	Interaction	Taille	Description
M	Lin / *Melampsora lini*	<1000 kb	~15 autres gènes dont ~5 transcrits mais fonction inconnue
RPP1	*Arabidopsis* / *Peronospora*	50 kb	8 à 10 membres selon les écotypes qui pourraient avoir une fonction
Mla	Orge / *Blumeria*	240 kb	11 membres au moins de trois familles différentes. Certains gènes nécessitent le gène Rar1 ou Rar2
Pib	Riz / *Magnaporthe*		différences d'expression selon conditions environnementales
Pto-Prf	Tomate / *Pseudomonas*	400 kb	Les gènes n'ont pas tous la même origine. 5 copies de Pto. Origine de Pto avant la séparation des Solanum.
Cf-2 Cf-5	Tomate / *Cladosporium fulvum*		4 copies de Cf5 qui semblent fonctionnelles. 2 copies fonctionnelles confèrent la résistance Cf2. Origine commune Cf2/Cf5.
Cf-4 Cf-9 Hcr9	Tomate / *Cladosporium fulvum*	36 kb	Hcr9 comporte 5 gènes R fonctionnels. Cf9 nécessite Rcr1 et Rcr2 pour fonctionner.
Xa21	Riz /*Xanthomonas*	230 kb	8 gènes répartis en deux familles peut-être issues d'une duplication. Un gène tronqué Xa21D en partie fonctionnel.

Tableau 3.1. Quelques exemples de gènes organisés en Cluster.

La liste de gènes n'est pas exhaustive. La dernière colonne présente les caractéristiques des autres copies du cluster.

la NBS-LRR de PRF qui serait prise comme cible par l'éliciteur *AvrPto* de l'agent pathogène (Mucyn *et al.*, 2006). Beaucoup de NBS-LRR utilisent des protéines chaperones : RAR1 pour MLA (Bieri *et al.*, 2004), SGT1 pour BS2 (Leister *et al.*, 2005) et HSP90 pour RPM1 (Hubert *et al.*, 2003). Ces protéines seraient des régulateurs car elles déclencheraient la dégradation des protéines de résistance.

c L'organisation des gènes de résistance dans le génome

Le nombre de loci comprenant un (loci simples) ou plusieurs (clusters) gènes de résistance a été déterminé dans le génome d'*A. thaliana* (Richly *et al.*, 2002). La majorité des loci sont simples, mais la majorité des RGA appartiennent à des loci complexes : 51 des 91 loci sont des loci simples (soit 56%) mais 115 des 166 NBS-LRR (soit 69,3%) appartiennent à un cluster de 18.5 kb en moyenne. Chez le riz, la distribution en cluster des RGA, et notamment des NBS-LRR, a également été démontrée (Monosi *et al.,* 2004) : 90 des 223 loci sont des loci simples (soit 40,3%) mais 383 des 473 NBS-LRR appartiennent à un cluster (soit 81%). Les clusters de NBS-LRR chez le riz se composent de 2 à 12 copies et leur répartition dans le génome est hétérogène (Figure 3.3). Certaines régions du génome comme les chromosomes 11 et 12 sont très riches en clusters de RGA. Ainsi, 25% des NBS-LRR sont cartographiés sur le chromosome 11. Toutefois, ces estimations sont purement indicatives puisque, pour un même locus, la structure peut être différente selon les variétés. Par exemple, dans le cas du locus des gènes de résistance à la pyriculariose *Pi2/Pi9* de quatre à neuf copies de NBS-LRR sont présentes selon les variétés (Zhou *et al.*, 2007).

L'étude de la diversité génétique de l'espèce au niveau d'un locus de résistance peut mettre en évidence plusieurs allèles de résistance capables de reconnaître différents facteurs d'avirulence de l'agent pathogène. Bien que le plus souvent, un seul allèle codant pour la résistance soit détecté à un locus (Stahl *et al.*, 1999), des exceptions existent. C'est le cas des gènes *L* chez le lin (Dodds *et al.*, 2004) et *Rpp13* chez Arabidopsis (Bittner-Eddy *et al.,* 2000) qui présentent de nombreux allèles de résistance. Enfin, un autre cas plus extrême, est le cas de loci dont l'allèle sensible correspond à un allèle nul (*Rpm1* et *Rps2* chez Arabidopsis ; Hulbert *et al.*, 2001).

L'organisation en cluster pose le problème de la fonction des autres membres du cluster, notamment au cours de l'infection (Tableau 3.1). Les clusters de RGA peuvent être homogènes ou hétérogènes, c'est-à-dire qu'ils peuvent rassembler des gènes issus d'une seule duplication ou des gènes issus de différentes familles de gènes (Hulbert, 2001 ; Leister, 2004). *Pto /Prf* est un exemple de cluster hétérogène. Le locus *Mla* de l'orge comporte 3 familles différentes de gènes NBS-LRR codant pour des protéines ayant moins de 33 % d'homologie (Wei *et al.,* 1999). De

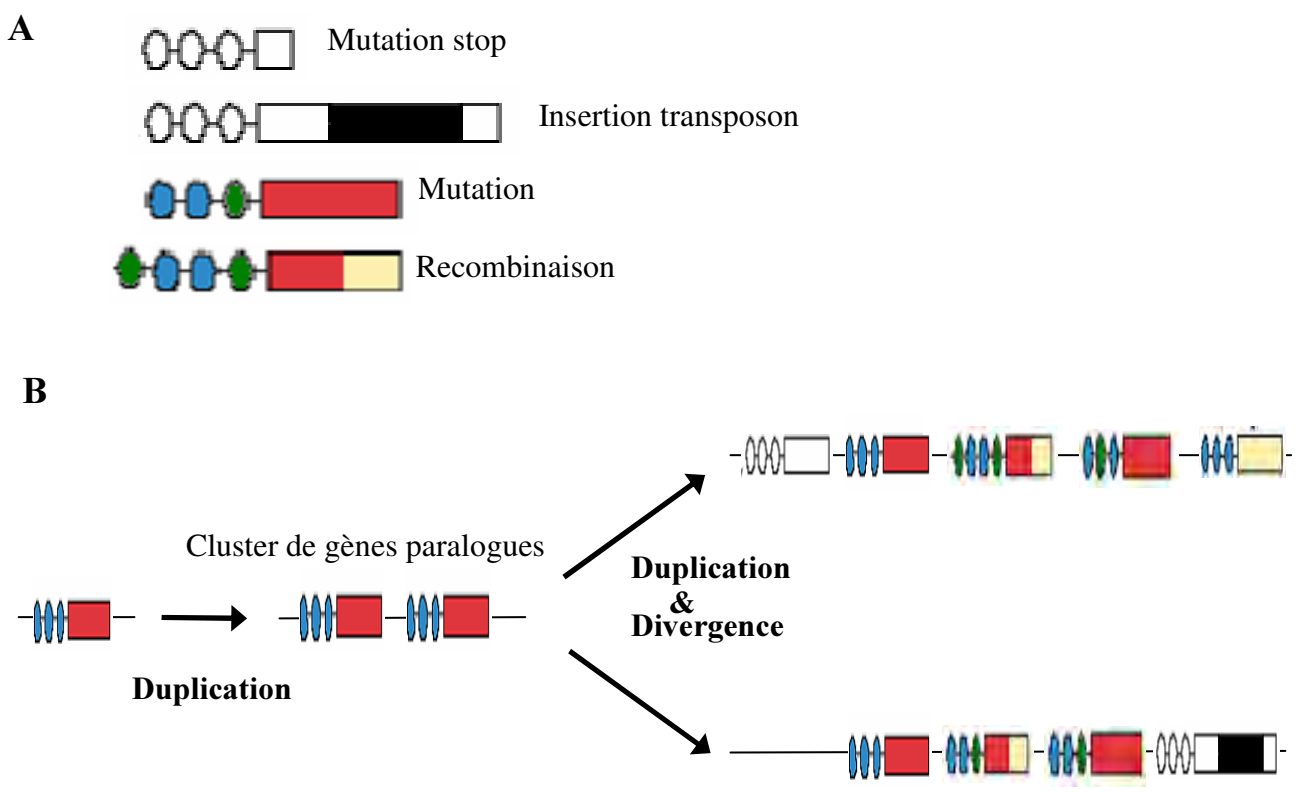


Figure 3.4. Évolution des gènes de résistance organisés en cluster.

D'après Moore et Purugganan, 2005.

A = Différents mécanismes d'évolution des Cluster.

B = Modèle d'évolution basé sur le modèle « birth and death » de Michelmore et Meyers (1998). Le cluster « naît » lors d'une duplication puis évolue par des phénomènes de divergence et de duplication. Les phénomènes de recombinaison permettent entre autre la perte ou l'acquisition de nouveaux motifs LRR.

plus, des gènes issus d'une même famille (i.e. issus d'une même duplication) peuvent se répartir sur plusieurs chromosomes (Monosi *et al.,* 2004). Lorsque les gènes sont organisés en cluster, en général, un seul paralogue est responsable de la résistance. Certains sont non fonctionnels du fait d'un codon stop ou de l'insertion d'éléments transposables, mais ils ont pu avoir une fonction par le passé (Sun, 2001). Les multiples études sur l'expression des membres de familles multigéniques ne permettent pas de tirer une règle générale sur le rôle potentiel des paralogues. Une étude dans un cluster du soja montre que plusieurs gènes, dont certains sont tronqués, sont exprimés, certains de manière constitutive et d'autres de manière inductible (Graham *et al.*, 2002). L'expression de ces gènes pourrait également dépendre de stress environnementaux. Dans le cas de *Cf2* chez la tomate plusieurs paralogues très similaires sont responsables de la même résistance (Dixon *et al.*, 1996). Certains paralogues peuvent également présenter des fonctions partielles comme *Xa21D* (Wang *et al.*, 1998) qui reconnaît les mêmes souches de *Xanthomonas oryzae* que *Xa21* mais qui déclenche seulement une résistance partielle (Wang *et al.*, 1998). Certains clusters peuvent rassembler des gènes de résistance à différents agents pathogènes. C'est le cas, par exemple, chez la pomme de terre où les gènes Ry_{adg}, Na_{adg}, R_{Mc1} et $Sen_{1,}$ cartographiés au niveau du même marqueur, permettent respectivement une résistance à deux virus, un nématode et un champignon (Gebhardt et Valkonen, 2001).

III.1.2 Hypothèses moléculaires de l'évolution des gènes de résistance

Une théorie assez consensuelle a été proposée pour expliquer l'organisation des gènes en cluster : le «birth and death model» (Michelmore et Meyers, 1998) (Figure 3.4). Cette théorie explique assez bien la formation des clusters homogènes mais n'est pas encore complètement satisfaisante pour les clusters hétérogènes.

Un premier gène apparaîtrait puis se dupliquerait et évoluerait ensuite par différents mécanismes. Cette duplication peut avoir lieu en tandem ou être transposée sur un autre chromosome. Dans le cas des familles de NBS-LRR, la duplication en tandem serait particulièrement importante pour générer de nouvelles résistances (Cannon *et al.*, 2004). De nouvelles spécificités seraient ensuite générées par plusieurs mécanismes (Figure 3.4) dont les principaux sont les crossing-over inégaux et les mutations ponctuelles. Les mutations ponctuelles seraient particulièrement importantes dans certaines zones des domaines LRR qui sont supposées interagir avec un ligand. La sélection s'opérerait ensuite sur un allèle qui présente une résistance avantageuse et cet allèle envahirait rapidement la population. Ainsi, les copies dupliquées du gène ancestral, pourraient soit acquérir de nouvelles fonctions, soit devenir des pseudogènes. Elles pourraient également servir de réservoir de diversité en permettant de nouvelles combinaisons via les crossing-over inégaux. Le rôle des transposons dans l'évolution des gènes de résistance a

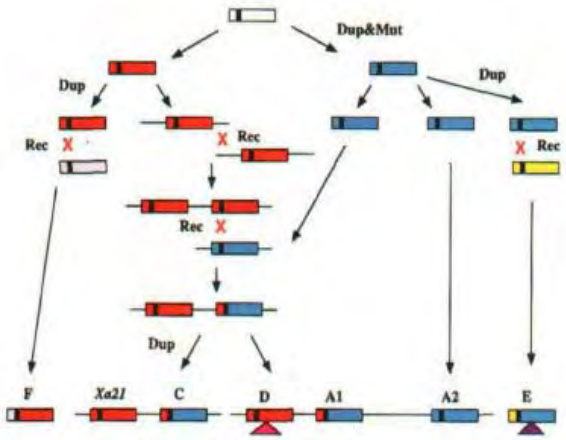


Figure 3.5. Modèle d'évolution du cluster *Xa21.*

D'après Song *et al.* (1997). Les barres représentent les membres de la famille *Xa21*. Les couleurs indiquent les relations entre ces membres : blanc, récepteur-kinase ancestral ; rouge, gène de type *Xa21* ; bleu, membre de type A2 ; rose et jaune, autres membres inconnus. Les sites de recombinaison supposés sont indiqués par une croix. Dup=duplication ; Mut=mutation ; Rec=recombinaison.

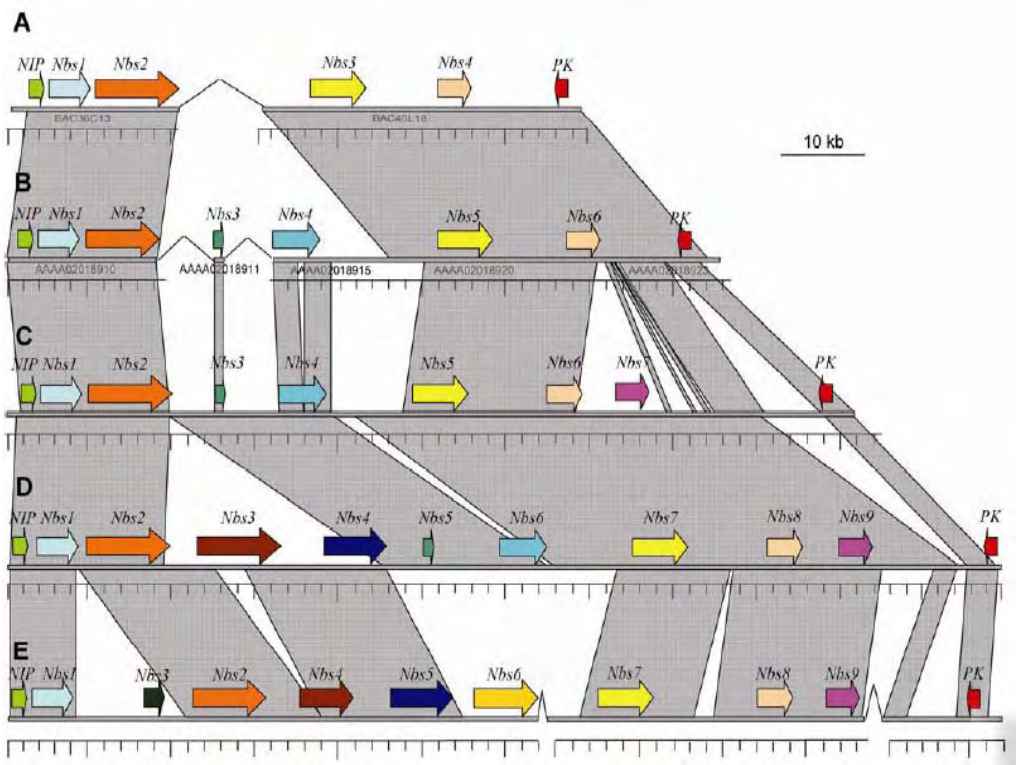


Figure 3.6. Analyse comparative du locus *Pi2/9* dans cinq variétés.
D'après Zhou *et al.* (2007). Les gènes de la famille *Pi2/9* (Nbs) sont représentés par des flèches dont la couleur représente un orthologue. Les régions présentant plus de 98% d'identité nucléique sont grisées. *NIP*=nitrate-induced protein; *PK*=protein kinase.
A- locus *Pi2/9* dans la variété sensible *indica Co39.* B- locus *Pi2/9* dans la variété sensible *indica* 9311. C- locus *Pi2/9* dans la variété sensible *japonica* Nipponbare. D- locus *Pi2* dans la variété indica résistante C101A51. E- locus *Pi9* dans la variété résistante indica 75-1-127.

également été démontré (Ramakrishna *et al.*, 2002). Ils peuvent favoriser les crossing-over inégaux si deux transposons similaires s'insèrent dans un cluster. Ils peuvent également supprimer la fonction d'un gène en s'insérant dans sa partie codante. C'est le cas, par exemple pour les gènes *RPP5* chez Arabidopsis, *N* chez le lin, *Hm1* chez le maïs et *Xa21* chez le riz. Cependant, face à ces mécanismes qui augmentent la diversité, les familles multigéniques peuvent également subir un phénomène d'évolution concertée via un mécanisme de conversion génique qui homogénéise les différentes copies. Au niveau des clusters de gènes de résistance ce mécanisme de conversion génique semblerait limité (Dodds *et al.*, 2001 ; Baumgarten, 2003). D'autre part, un des résultats de l'évolution par le modèle « birth and death » est que les orthologues seraient plus similaires entre eux que les paralogues au locus (Nei *et al.*, 2005). Ce qui est effectivement couramment observé, comme par exemple dans le cas des LRR-kinases du riz (Sun *et al.*, 2006). Cependant, des exceptions sont possibles, c'est le cas notamment au locus *Cf2* de la tomate (Caicedo et Schaal, 2004).

Les exemples pouvant correspondre au modèle «birth and death» sont nombreux. On peut citer le cas de *Xa21* et de *Pi2/Pi9*. Le clonage des sept membres du cluster *Xa21* a permis de faire une hypothèse sur l'évolution du cluster (Song *et al.*, 1997). Les phénomènes de recombinaison, duplication et transposition auraient tous joué un rôle dans l'évolution du cluster (Figure 3.5). Ainsi, une première duplication très ancienne aurait permis d'obtenir deux familles de paralogues qui auraient ensuite évolué par mutation et recombinaison l'une avec l'autre. La région étant également très riche en éléments transposables, ceux-ci ont joué un rôle notamment en rendant au moins deux copies non fonctionnelles par insertion d'un transposon dans leurs séquences codantes. L'évolution du cluster *Pi2/Pi9* a été étudiée chez cinq variétés de riz : C101A51 (*Pi2*), 75-1-127 (*Pi9*), Co39, 93-11 et Nipponbare (Zhou *et al.*, 2007). Ce cluster est dit homogène car tous ses membres seraient issus de la duplication d'un gène ancestral (Figure 3.6). Les membres du cluster présentent cependant une grande divergence de leur partie 5'. Notamment, ils mettent en évidence une expansion de la taille de l'intron. Ces divergences sont beaucoup moins visibles entre orthologues. Ces divergences dans les parties 5' ont pu agir comme suppresseur de la recombinaison ce qui a permis de maintenir l'équilibre entre diversification du cluster et homogénéisation.

Les questions qui restent posées aujourd'hui ont trait à l'évaluation des mécanismes qui jouent un rôle principal dans l'évolution des clusters : les recombinaisons, les mutations, les transpositions ? Les trois mécanismes jouent probablement un rôle mais peut-être pas aux mêmes stades de la « vie » du cluster. L'autre question est de comprendre quel est le rôle des autres

membres du cluster. Jouent-ils un rôle dans une résistance à un autre agent pathogène, ou dans l'acquisition de nouvelles spécificités ?

III.1.3 Objectifs

Pour étudier l'interaction *ACE1/Pi33*, notre objectif principal était de cartographier physiquement *Pi33* et de le cloner. La cartographie physique du gène a été réalisée dans une variété indica résistante (IR64). Pour cela une banque BAC a été criblée et des BAC candidats séquencés. L'existence des séquences complètes de deux variétés japonica (Nipponbare) et indica (93-11) sensibles a permis des comparaisons de la structure du locus. Des séquences d'une partie du locus sont également en cours d'obtention chez une autre variété indica sensible et chez des espèces sauvages du genre *Oryza*. Le but était d'identifier les gènes candidats présents dans les variétés résistantes et d'apporter un éclairage sur le fonctionnement du cluster et son évolution en comparant sa structure dans différents génotypes.

Pour le clonage du gène, plusieurs approches ont été envisagées en parallèle. La première approche est basée sur la recherche de gènes candidats. En effet, la caractérisation du cluster peut faciliter le clonage du gène en éliminant certains candidats. Cette caractérisation peut se faire à différents niveaux. La diversité structurale, allèlique et transcriptomique des différents membres du cluster ont ainsi été évaluées. Cette approche permet non seulement de faciliter le clonage mais apporte également des réponses sur la diversité de *Pi33*. Quelle est la diversité au sein des gènes au locus *Pi33* ? Tous les membres du cluster sont-ils fonctionnels ? Une deuxième approche d'identification de *Pi33* s'appuit sur la recherche de mutants. Une banque de mutants de la variété IR64, disponible à l'IRRI, a été criblée par TILLING sur trois gènes candidats. Une banque de mutants de la variété résistante C101LAC a été criblée phénotypiquement pour mettre en évidence des lignées mutées dans le gène *Pi33* qui pourront être ensuite caractérisées. Enfin, la troisième approche envisagée pour le clonage est une méthode plus classique de complémentation d'une variété sensible par de l'ADN génomique de la variété résistante IR64. La complémentation par des BAC entiers ou une partie des BAC identifiés lors de la cartographie physique a été mise en oeuvre. Des complémentations par des séquences complètes de certains gènes candidats ont également été tentées.

Ce chapitre fait le bilan de la cartographie physique de *Pi33*, de la caractérisation de son locus et des différentes approches ayant pour objectif son clonage.

Pour nommer les gènes candidats, nous avons adopté le système de notation suivant : (Nom de la variété)-(Type de gène)-(Numéro du gène au locus). Le code pour le nom de la

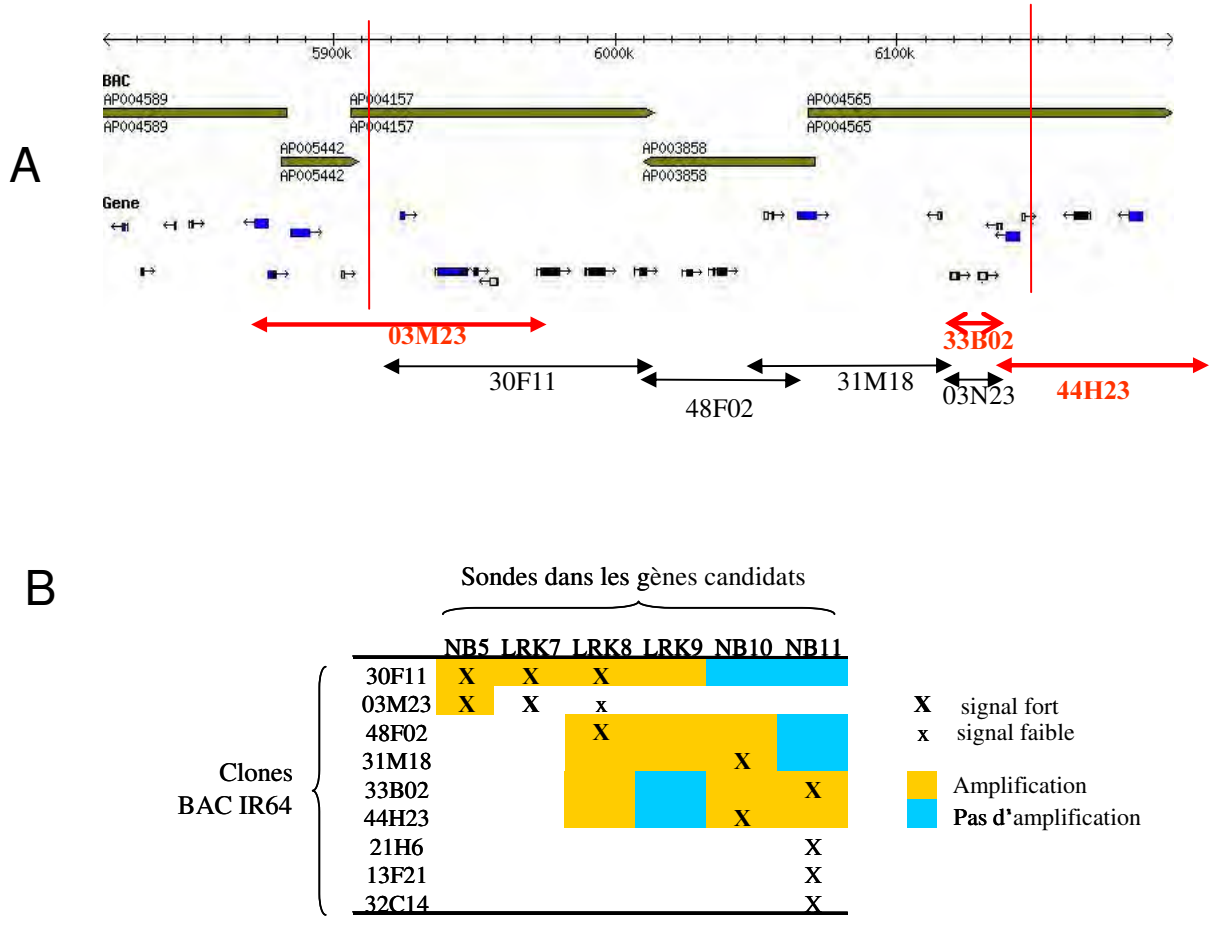


Figure 3.7. Cartographie physique chez IR64.

A= Cartographie physique chez IR64. B = bilan du criblage de la banque BAC IR64 par hybridation et par amplification.

En A, une cartographie du cluster est dessinée chez la variété de référence Nipponbare. En dessous, les flèches représentent la position des clones BAC IR64 par homologie de séquence avec Nipponbare. En rouge les trois clones BAC séquencés, en noir les clones BAC en cours de séquençage.

En B, la croix représente un résultat d'hybridation avec un signal plus ou moins fort pour chacune des sondes testées. Les couleurs correspondent aux amplifications par PCR à partir de l'ADN des différents clones BAC pour les différents gènes candidats. Les clones BAC identifiés par hybridation ont également été confirmés par un crible PCR sur colonies (voir annexe 11 pour le détail).

variété est « 64 » pour IR64, « Nip » pour Nipponbare et « 93 » pour 93-11. Le code pour le type de gène est « LRK » pour les LRR-kinases et « NB » pour les NBS-LRR.

III.2 Résultats

III.2.1 Cartographie physique de *Pi33*

Pi33 a été cartographié à partir des descendants du croisement IR64 x Azucena entre deux marqueurs distants de 0.4 cM (RMS*Pi33*-53 et RM3507), situés à 10 cM de la position publiée par Berruyer *et al.* (2003). A partir de cette position génétique, une position physique a pu être établie *in silico* dans les deux variétés de riz sensibles séquencées : la variété japonica Nipponbare (Goff *et al.*, 2002 ; International Rice Genome Sequencing Project, 2005) et la variété indica 93-11 (Zhao *et al.*, 2004).

Cette cartographie a été complétée par une cartographie physique dans la variété résistante IR64, en utilisant une banque BAC disponible (Yang *et al.*, 1997). Deux criblages successifs (par hybridation et par PCR sur colonies) ont permis d'établir une cartographie physique chez la variété IR64 (Figure 3.7). La zone de 240 kb chez la variété de référence Nipponbare est couverte par sept clones BAC chez IR64, représentant une taille estimée de 300 kb. Les clones sont chevauchants à l'exception possible des clones 33B02 et 31M18. D'après l'alignement des séquences disponibles de ces clones sur la séquence de Nipponbare, la zone non couverte serait de quelques kb puisque les deux extrémités de BAC se situent dans une copie de NBS-LRR qui correspondrait au gène 64-NB10-2 (Figure 3.12). Le séquençage des sept clones BAC identifiés dans la zone est en cours. Pour l'instant, trois clones ont déjà pu être séquencés par shotgun : 03M23, 33B02 et 44H23 (de 80kb, 60kb et 120 kb respectivement). Le séquençage par shotgun génère des séquences courtes (<700 bp) qu'il faut assembler en séquences plus longues, appelée contigs, sur la base de leurs homologies. La présence de séquences répétées dans la zone étudiée rend l'assemblage plus difficile car il faut pouvoir distinguer les copies paralogues. De plus, le séquençage peut être incomplet et des trous parfois importants persistent entre les contigs. Les trois clones BAC d'IR64 ont été assemblés et annotés (Figure 3.9 et Annexe 7). L'assemblage du clone 03M23 constitué de trois contigs a pu facilement être complété et l'ordre des contigs a pu être défini par analogie avec la séquence de référence de Nipponbare. Lors de l'assemblage du clone 44H23, il s'est avéré qu'une partie des séquences (34 kb) était homologue au chromosome 5 de Nipponbare. Ce clone est donc une chimère entre le chromosome 5 et le chromosome 8. Cependant l'assemblage de ce clone a permis de construire un contig de 73 kb situé sur le chromosome 8. Enfin, l'assemblage du clone 33B02 est incomplet du fait de séquences insuffisantes pour permettre d'ordonner les neuf contigs obtenus. Par analogie avec la

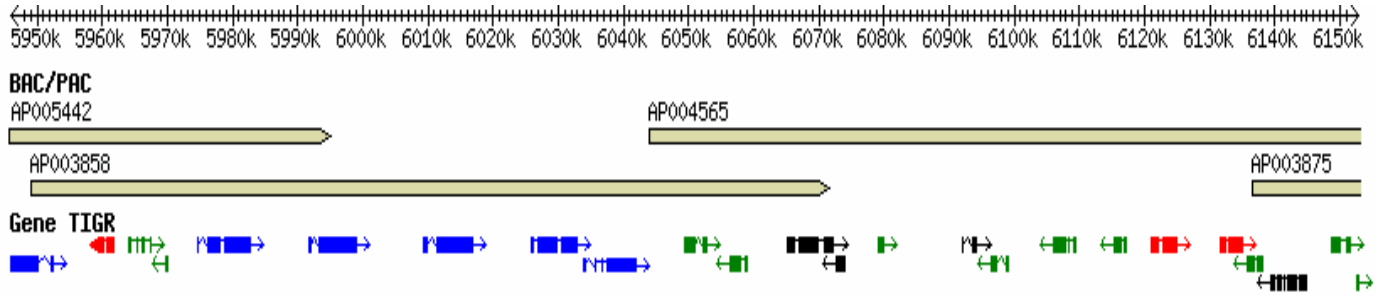


Figure 3.8. Annotation du locus *Pi33* dans la variété japonica Nipponbare.

Les annotations sont celles prédites par TIGR (The Institute for Genomic Research). En bleu = LRR-Kinase, en rouge = NBS-LRR, en noir = éléments transposables, en vert = divers gènes. Figure obtenue à partir de l'outil GBrowse de la base de données OrygenesDB.

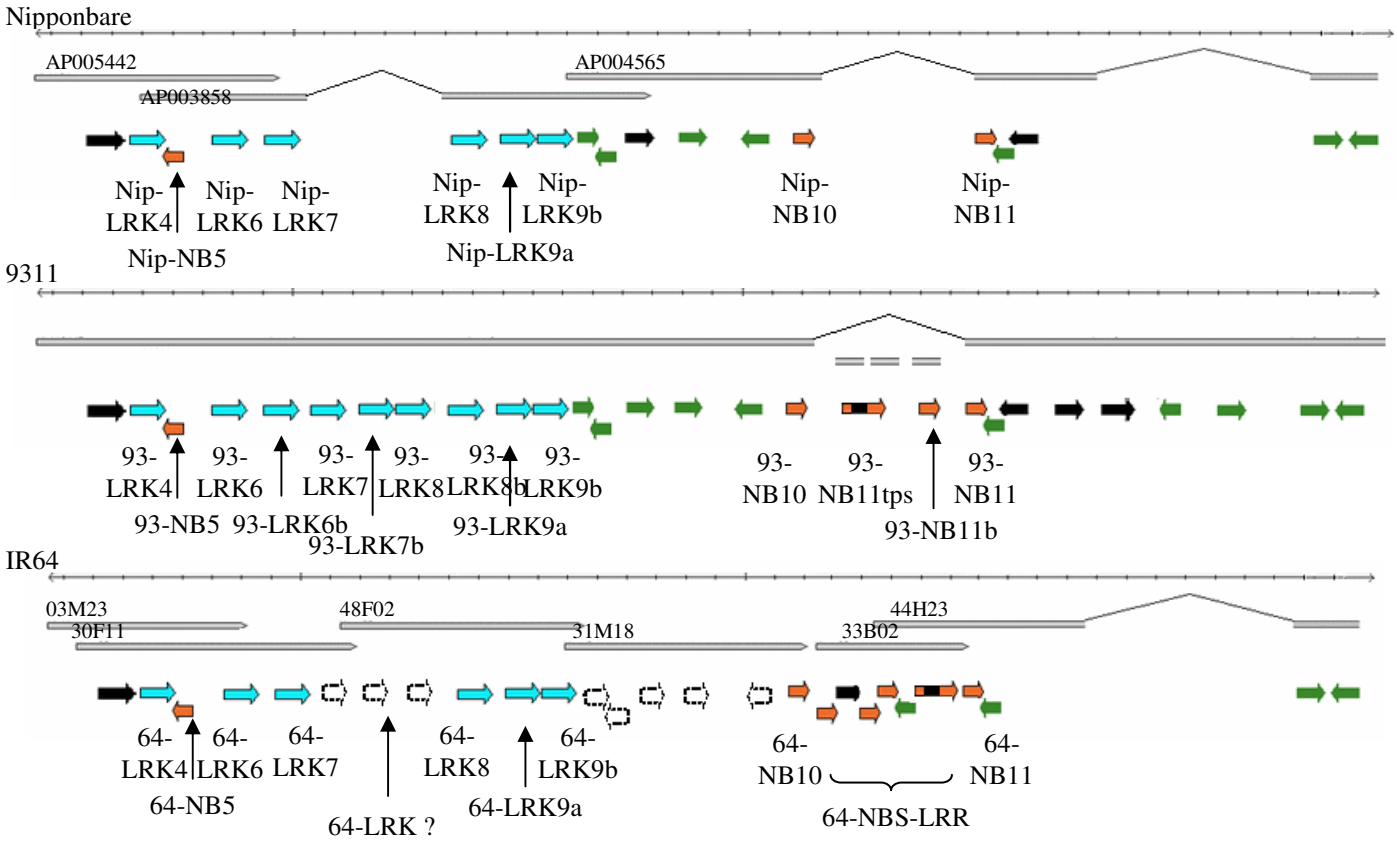


Figure 3.9. Structure comparative du locus *Pi33* dans trois variétés.

Nipponbare (japonica sensible), 93-11 (indica sensible) et IR64 (indica sensible). Les gènes prédits sont représentés en bleu, vert, orange et noir pour les LRR-kinase, divers gènes exprimés, NBS-LRR et les éléments transposables respectivement.

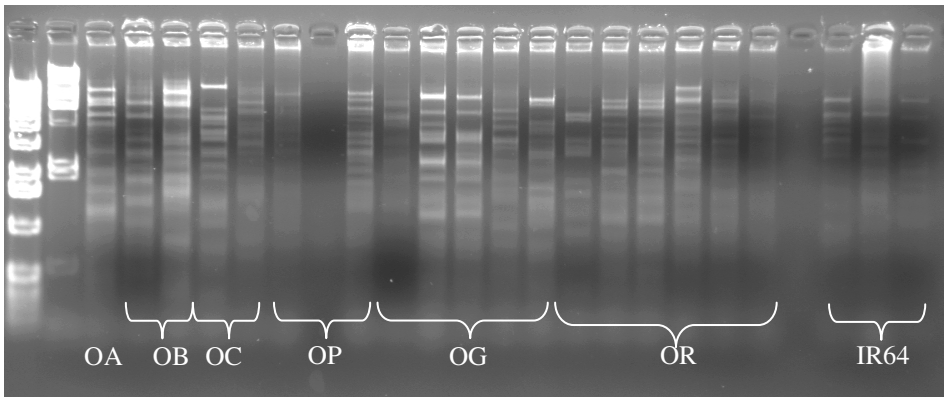


Figure 3.10. Profil de restriction des clones BAC identifiés au niveau du cluster *Pi33*.

OA = *O. alta,* OB = *O. brachyantha,* OC = *O. coarctata,* OP = *O. punctata,* OG = *O. glaberrima,* OR = *O. rufipogon.* Les clones sont disposés dans l'ordre (voir figure suivante).

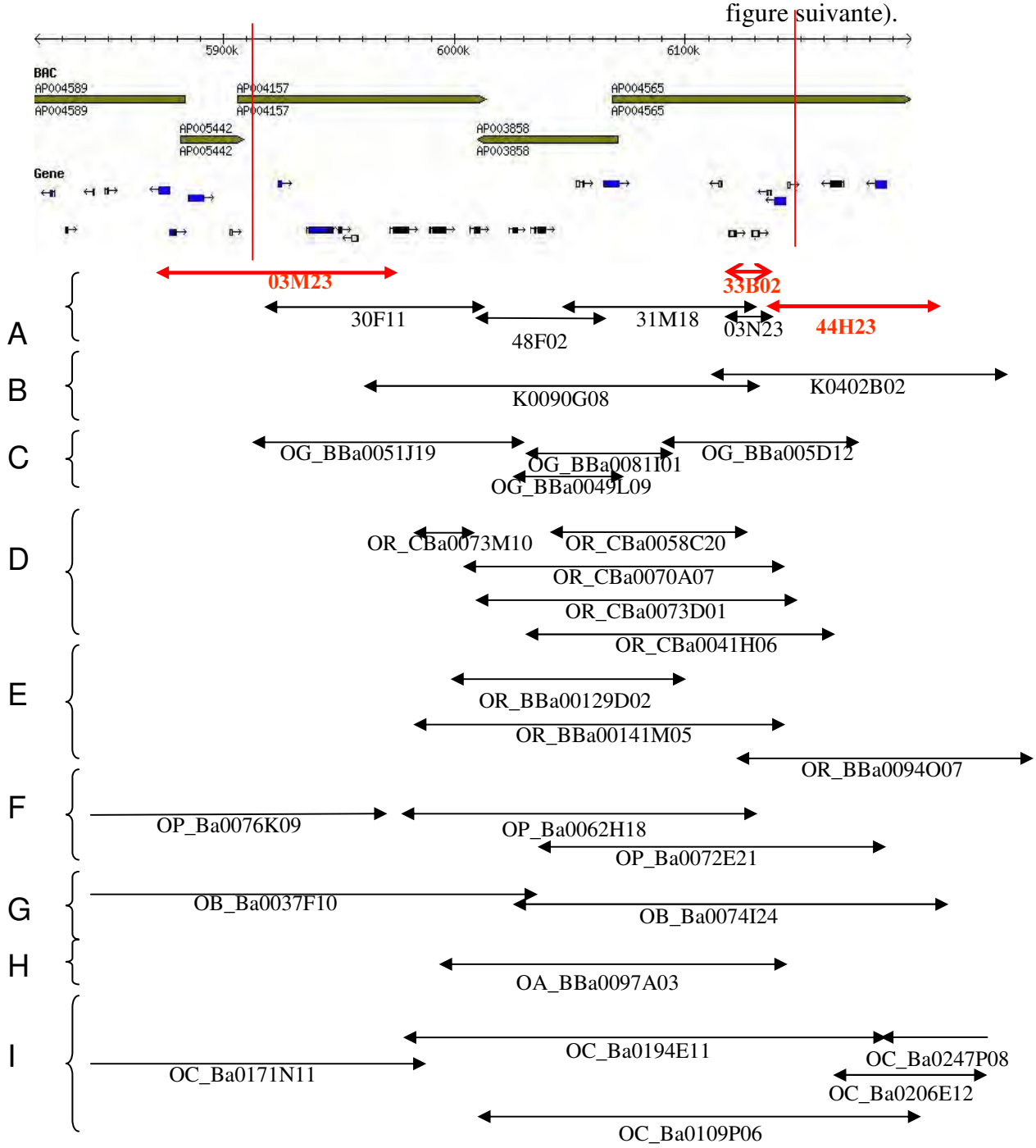


Figure 3.11 : Cartographie du locus *Pi33* à partir des différentes banques BAC.

A = IR64, B = Kasalath, C = *O. glaberrima*, D = *O. rufipogon*, E = *O. nivara*, F = *O. punctata*, G = *O. brachyantha,* H = *O. alta*, I = *O. coarctata.*

séquence du clone 44H23 qui chevauche 33B02, six de ces contigs ont toutefois pu être ordonnés. Cependant, les trois contigs non chevauchants avec 44H23 ne peuvent être assemblés avec certitude. Bien que l'assemblage ne soit pas complet dans certaines zones, ces annotations permettent d'établir la présence de quatre gènes candidats supplémentaires de type NBS-LRR chez IR64 à la fin du cluster (Figure 3.9 et 3.12).

Pi33 ayant une origine ancienne (voir chapitre 1), il peut être intéressant d'étudier l'évolution de la structure du cluster dans différentes espèces. A cette fin, une cartographie physique *in silico* a été entamée pour huit autres accessions : dans une autre variété indica sensible (Kasalath ; Katagiri *et al.*, 2004) et dans sept accessions de riz sauvages (Oryza Map Alignment Project ; Wing *et al.*, 2005). Pour ces banques BAC, les séquences des extrémités de BAC sont disponibles sur Internet et ancrées sur le génome de la variété de référence Nipponbare (http ://www.genome.arizona.edu/stc/rice/) (Annexe 11). Vingt-cinq clones BAC candidats ont ainsi été identifiés (Figure 3.10 et Figure 3.11). Six de ces clones qui couvrent le cluster de NBS-LRR sont en cours de séquençage par le Génoscope (Annexe 11).

Les séquences des génomes des deux variétés de référence (Nipponbare et 93-11) ont été annotées dans la zone définie par cartographie génétique (Figure 3.8, 3.9, 3.12 et Annexe 6). Cette zone correspond à 240kb chez Nipponbare et contient 23 gènes dont neuf RGA qui pourraient être des homologues de *Pi33* : des NBS-LRR et des LRR-kinases de type RD. Le fait que les LRR-kinases soient de type RD en font de moins bons candidats car les récepteur-kinases impliquées dans les interactions avec les agents pathogènes sont plutôt de type non RD (voir ci-dessus paragraphe III-1-1-a-1). Comme la plupart des NBS-LRR du riz, les NBS-LRR du locus sont constitués de deux exons qui scindent le domaine NB en deux. De plus, de manière similaire aux autres NBS-LRR de résistance à la pyriculariose clonés, le domaine LRR n'a pas pu être clairement identifié car les motifs LRR ne sont pas conservés (voir Introduction Paragraphe I-2-4). Ce domaine situé en partie C-terminale correspond en fait à un domaine riche en leucine (LRD Leucine Rich Domain).

La comparaison des annotations des séquences des trois variétés Nipponbare, 93-11 et IR64 indique tout d'abord une taille du cluster variable : 240 kb chez Nipponbare, 360 kb chez 93-11 et 300 kb chez IR64. Cette zone est également riche en éléments transposables (quatre chez Nipponbare, trois chez 93-11 et huit chez IR64). Le cluster comporte deux types d'analogues de gènes de résistance : des NBS-LRR et des LRR-kinase. D'autres gènes sont présents au locus, mais ils sont soit de fonction inconnue, soit ils n'ont pas de fonction connue dans la résistance.

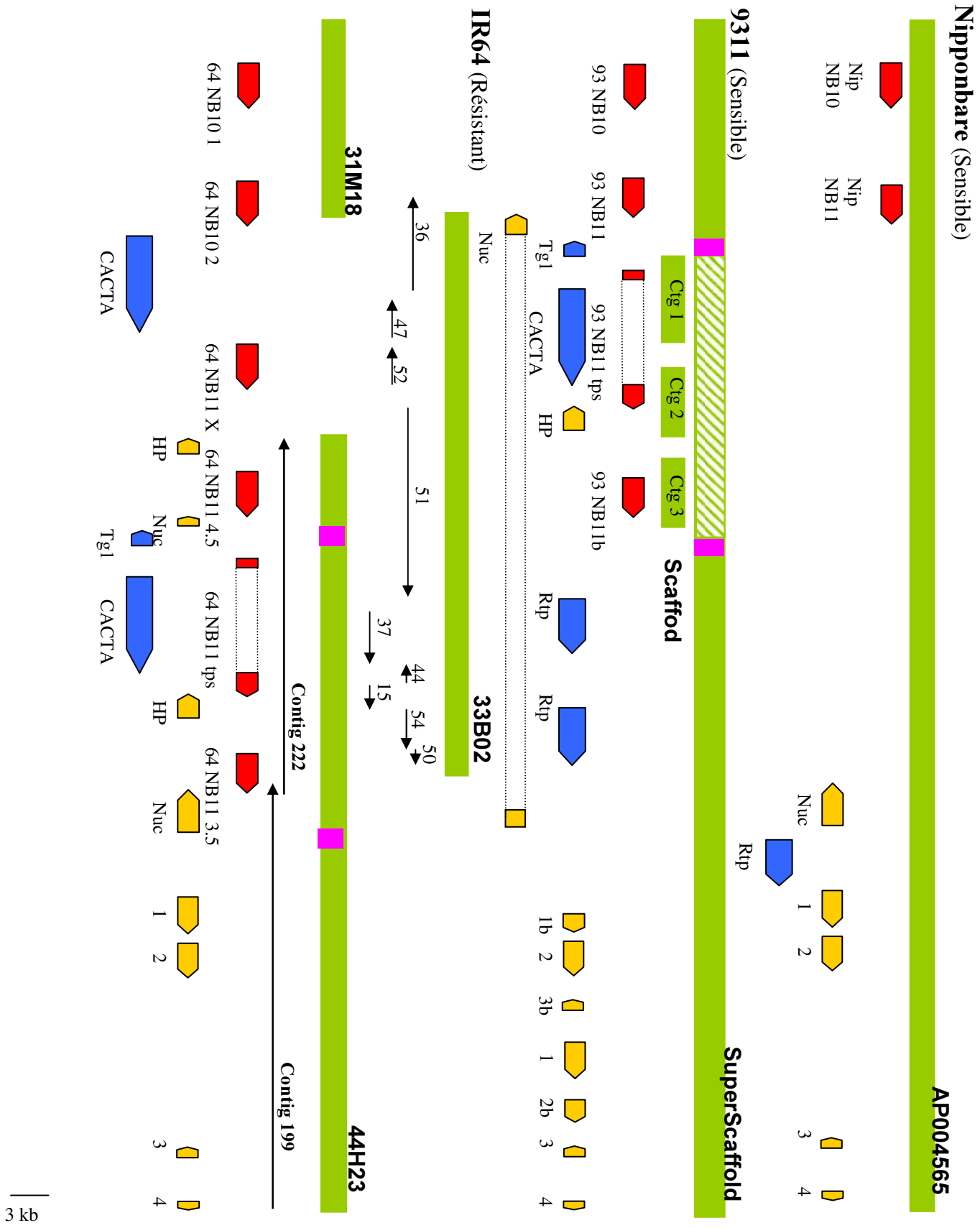


Figure 3.12. Annotation de la fin du locus *Pi33*.

En rouge les gènes candidats de type NBS-LRR, en jaune les autres gènes, en bleu les éléments transposables. HP = Protéine Hypothétique, Nuc = Transporteur de Nucléoside, 1 = Os08g10470, 2 = Os08g10480, 3 = Os08g10490, 4 = Os08g10500, CACTA = Transposon CACTA, Tg1 = Rétrotransposon, Ctg1 = AAAA02041188, Ctg2 = AAAA02042661, Ctg3 = AAAA01016632. Les flèches sous les clones BAC correspondent aux contigs séquencés et assemblés.

On peut citer par exemple, un transporteur de nucléoside (Os08g10450) qui est très conservé puisque des orthologues sont présents dans la plupart des céréales et chez Arabidopsis.

Les gènes annotés dans la variété Nipponbare sont en général conservés dans les deux autres variétés. Si l'on compare Nipponbare et 93-11 (Figures 3.9 et 3.12), les seuls ORFs absents chez 93-11 sont quatre éléments transposables (Os08g10360, Os08g10370, Os08g10390 et Os08g10460). Par contre, la variété 93-11 présente neuf ORFs supplémentaires qui correspondent souvent à des duplications de gènes déjà présents chez Nipponbare. 93-11 possède notamment trois copies supplémentaires de LRR-kinases. Si l'on compare Nipponbare et IR64 (Figures 3.9 et 3.12), là aussi les éléments transposables ne sont pas toujours conservés (absence de Os08g10460 chez IR64, présence de transposons CACTA chez IR64), et deux copies supplémentaires de gènes aux fonctions hypothétiques sont présentes chez IR64. De manière générale, la structure est relativement bien conservée (notamment au niveau du clone BAC 03M23) sauf au niveau des RGA. Ainsi, IR64 possède sept copies de NBS-LRR au lieu de trois chez Nipponbare.

Ces premiers résultats mettent ainsi en évidence une diversité de structure du cluster entre ces trois variétés. Ils mettent surtout en évidence une variation importante du nombre d'analogues de gènes de résistance entre ces trois variétés (9 chez Nipponbare, 12 chez 93-11 et au moins 12 chez IR64) et donc une variation du nombre de gènes candidats. Cependant, les variétés Nipponbare et 93-11 étant sensibles seuls les candidats présents chez IR64 peuvent être considérés comme des candidats intéressants pour *Pi33*. A partir de ces données de séquence du locus de *Pi33*, une étude plus complète sur la diversité structurale du locus et sur la diversité allèlique et transcriptomique des candidats a été entamée.

III.2.2 Structure et diversité au sein du cluster *Pi33*

Notre objectif était de caractériser le cluster *Pi33* afin, non seulement de faciliter le clonage en éliminant certains gènes candidats mais également d'évaluer la diversité du cluster à trois niveaux : diversité structurale, diversité allélique et diversité d'expression. Dans le chapitre 1 plusieurs origines pour l'allèle de résistance *Pi33* ont été mises en évidence. Deux hypothèses sont alors envisageables : 1) un seul gène est responsable du phénotype chez les différentes origines 2) au même locus, des gènes différents en fonction des sources confèrent la résistance. Ces deux hypothèses doivent être prises en compte dans l'interprétation des résultats d'analyse du polymorphisme des gènes candidats. Suivant la première hypothèse, le gène candidat doit être commun à toutes les variétés résistantes donc monomorphe chez ces variétés et polymorphe chez les variétés sensibles. Suivant la seconde hypothèse, la comparaison des individus résistants et sensibles ne sera informative que si ces individus sont génétiquement proches, au moins au locus

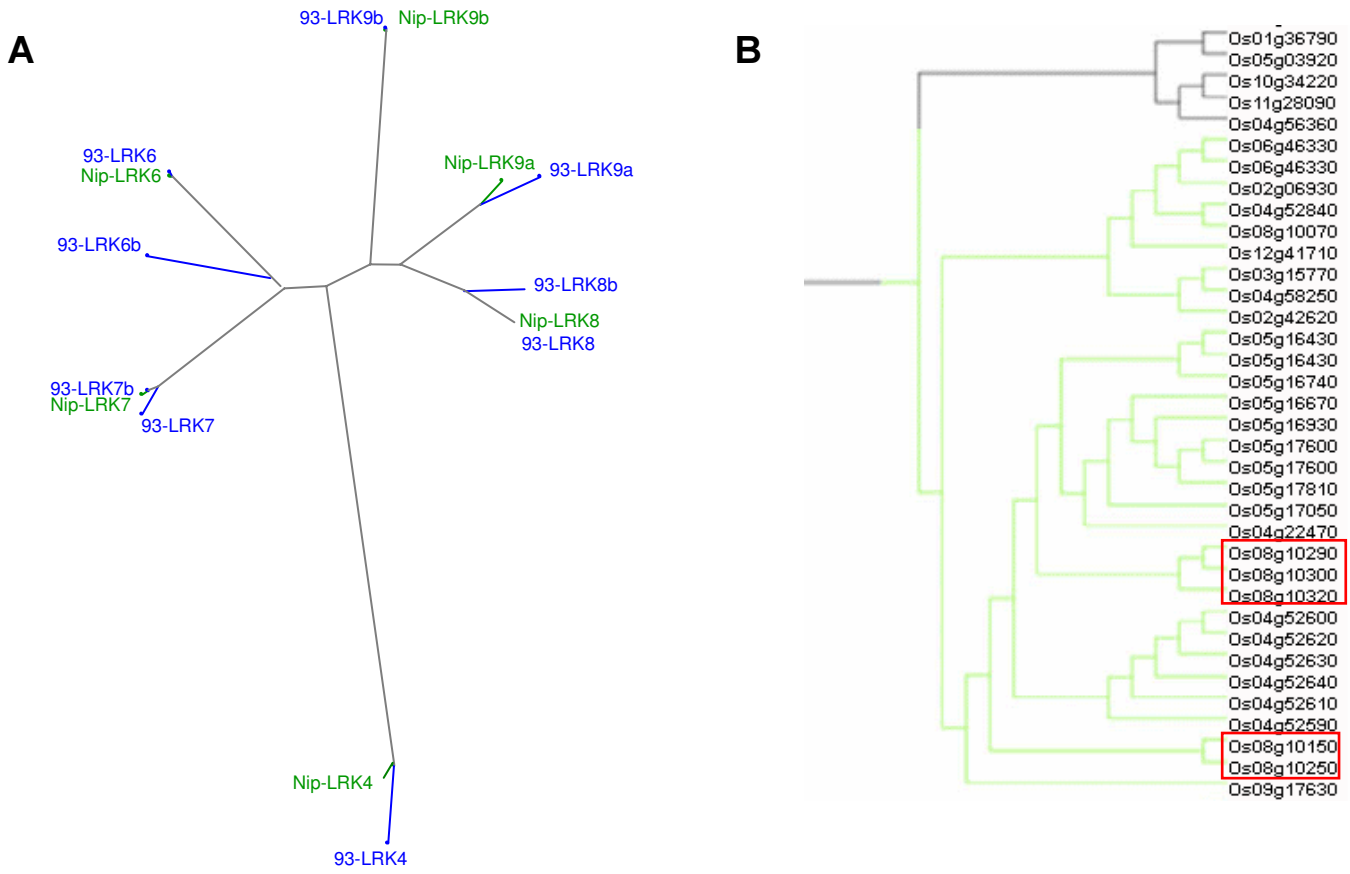


Figure 3.13. Similarité des LRR-kinases candidates au locus *Pi33*.

A = Arbre des LRR-kinases du locus *Pi33.* Les séquences complètes des gènes ont été alignées par CLUSTALW. L'arbre est construit par Neighbor Joining. Les séquences pour IR64 ont été retirées de l'analyse car elles étaient incomplètes. En bleu 93-11 et en vert Nipponbare. L'équivalence entre les N° TIGR et le code des gènes dans l'arbre est disponible en annexe 6.

B= Extrait de l'arbre des Kinases du riz d'après le Rice Kinase Database (http://rkd.ucdavis.edu/). En vert le clade dont font partie les LRR-kinases du locus *Pi33*. Encadrées en rouge, les LRR-kinases du locus *Pi33*.

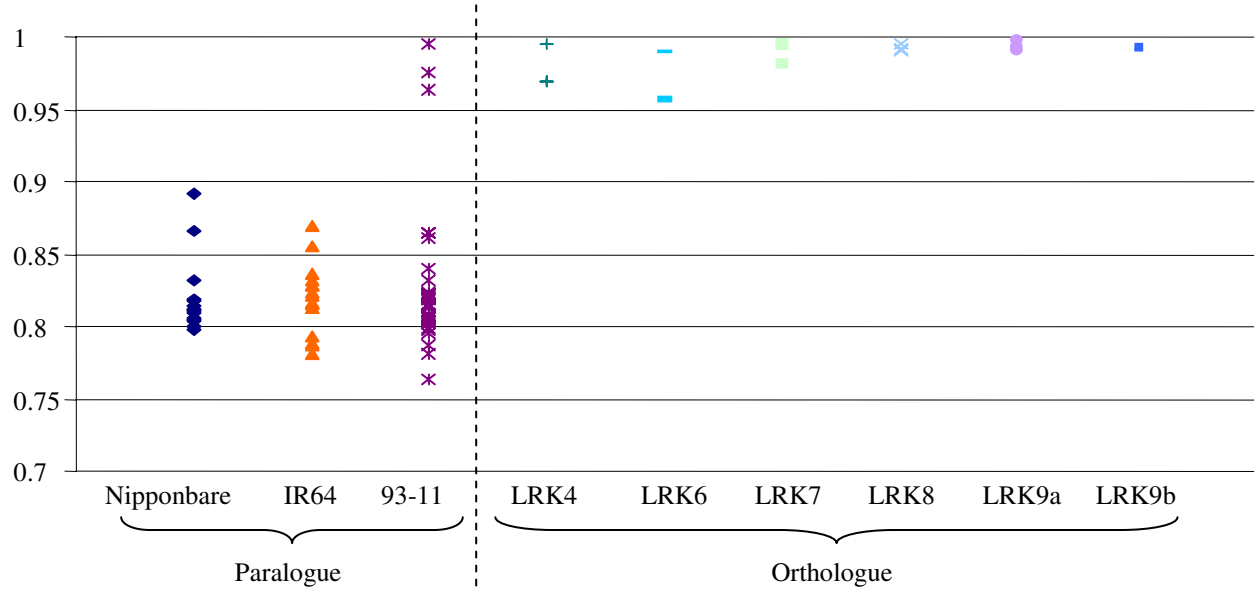


Figure 3.14. Pourcentage d'homologie de séquence entre les LRR-Kinases.

A gauche, les comparaisons sont effectuées entre les paralogues au sein d'une variété (Nipponbare, IR64 et 93-11). A droite les comparaisons son effectuées pour chaque gène candidat entre les trois variétés.

de *Pi33*. Nous disposons de trois couples Résistant/Sensible répondant à ce critère : C101Lac/C104Lac, IR64/IR36 et TYC/IR8.

a Polymorphisme structurale au sein du cluster

a.1 Diversité au sein du cluster de LRR-kinases

Même si les LRR-kinases situées au locus sont de moins bonnes candidates pour *Pi33*, il est important d'étudier leur structure, car l'évolution de cette famille a pu avoir une influence non négligeable sur l'histoire évolutive du cluster *Pi33*. Ainsi, au locus, un des NBS-LRR (NB5) est isolé au milieu des LRR-kinases. De plus, l'évolution des LRR-kinases peut être utilisée comme marqueur de l'évolution de l'ensemble du locus. Pour étudier le polymorphisme structural, nous disposons des séquences complètes du cluster dans deux variétés sensibles : les deux variétés séquencées (Nipponbare et 93-11). Une extension du cluster de LRR-kinases semble avoir eu lieu entre la variété japonica Nipponbare et la variété indica 93-11. En effet, six LRR-kinases sont réparties sur 105 kb chez Nipponbare contre neuf sur 155 kb chez 93-11 (Figure 3.9).

Les séquences disponibles chez Nipponbare et 93-11 ont été alignées avec CLUSTALW et un arbre a été construit par neighbor joining (Figure 3.13). Toutes les copies de LRR-kinases identifiées chez Nipponbare ont un orthologue chez 93-11. Dans l'arbre, les gènes orthologues se regroupent tous par paires, ce qui implique que la séparation indica-japonica a eu lieu après la duplication. Ainsi, le cluster de LRR-kinases du locus *Pi33* serait issu de duplications en tandem qui auraient eu lieu chez l'ancêtre commun. En tout cinq évènements de duplication successifs auraient abouti aux six LRR-kinases situées sur le chromosome 8. Il n'est pas possible de savoir si les gènes qui n'existent que chez 93-11 seraient issus de duplications qui dateraient d'après la spéciation ou alors si la copie orthologue a disparu chez Nipponbare. Le cluster de LRR-kinases aurait donc une origine ancienne (avant la séparation des deux sous-espèces). De plus, des homologues de ces gènes ont également été mis en évidence sur d'autres chromosomes (Figure 3.13). Il est probable que toutes ces copies soient issues d'un seul gène ancestral qui se serait amplifié sur plusieurs chromosomes puis une deuxième période d'amplification aurait eu lieu indépendamment sur chaque chromosome.

Les homologies de séquence ont été calculées par alignement deux à deux de chaque gène avec tous les autres (Figure 3.14 et Annexe 8). Les orthologues de Nipponbare ont pu être confirmés par leur pourcentage d'homologie de séquence. L'analyse des homologies de séquence permet de distinguer clairement deux niveaux d'homologie de séquence : une homologie supérieure à 96% qui correspond aux alignements d'orthologues et aux alignement de certains paralogues (notamment les copies supplémentaires présentent chez 93-11) et une homologie de

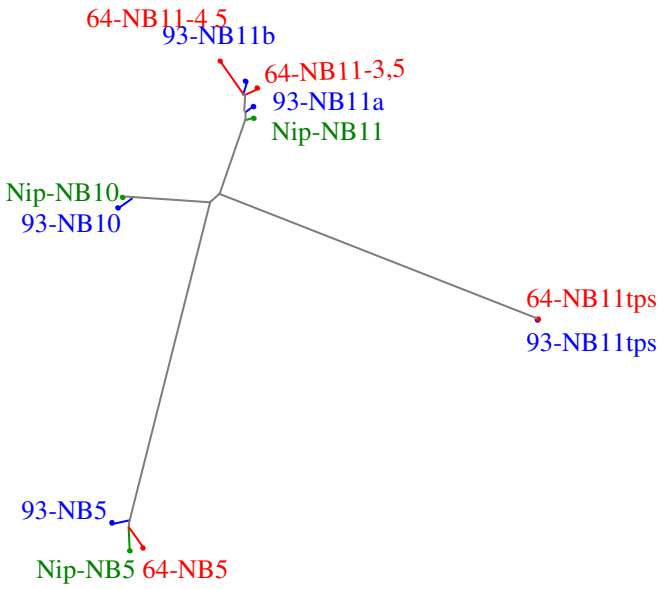


Figure 3.15. Arbre des NBS-LRR candidats au cluster *Pi33*.

Les séquences complètes des gènes ont été alignées par CLUSTALW. L'arbre est construit par Neighbor Joining. Trois des copies présentes chez IR64 n'ont pas été analysées car leurs séquences sont incomplètes. Les gènes 64-NB10-1 et 64-NB11-X ont été partiellement séquencés à partir de PCR et un fragment du gène 64-NB10-2 est présent dans un contig du clone BAC 33B02. L'équivalence entre les N° TIGR et le code des gènes dans l'arbre est disponible en annexe 6.

En bleu 93-11, en rouge IR64 et en vert Nipponbare.

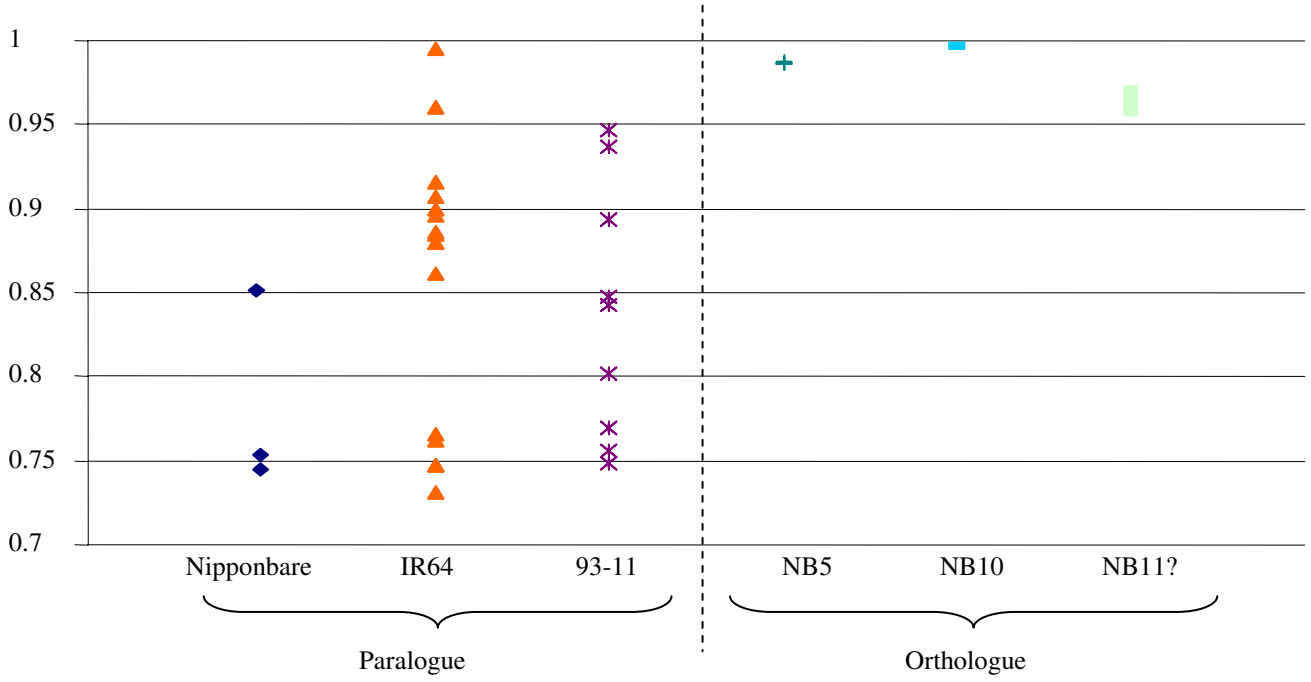


Figure 3.16. Pourcentage d'homologie de séquence entre les NBS-LRR.

A gauche, les comparaisons sont effectuées entre les paralogues au sein d'une variété (Nipponbare, IR64 et 93-11). A droite les comparaisons son effectuées pour chaque gène candidat entre les trois variétés.

séquence autour de 80% qui correspond aux alignements entre paralogues d'une même variété ou entre paralogues de deux variétés différentes.

a.2 Diversité au sein du cluster de NBS-LRR

Les séquences génomiques disponibles nous permettent également de comparer le cluster de NBS-LRR. Chez Nipponbare, deux copies sont très proches physiquement à la fin du cluster tandis qu'une troisième copie est isolée au sein du cluster de LRR-kinases. Ainsi, les trois copies se répartissent sur 160 kb.

Chez IR64, au moins sept copies de NBS-LRR sont présentent (Figure 3.12). Comme pour Nipponbare, un NBS-LRR (orthologue de Nip-NB5) est isolé au sein du cluster de LRR-kinases. Les six autres NBS-LRR sont groupés. Ce cluster a donc subi une extension chez IR64 puisque la copie homologue de Nip-NB11 ce serait dupliquée à au moins trois reprises. Bien que la structure semble relativement conservée entre Nipponbare et 93-11, au moins deux copies supplémentaires de NBS-LRR semblent présentes au locus chez 93-11. En effet, l'assemblage de 93-11 est basé sur une homologie de séquence avec le génome de Nipponbare. Or, l'analyse des contigs qui ont permis l'assemblage du génome de 93-11 permet de mettre en évidence trois contigs supplémentaires (AAAA02042661, AAAA01016632 et AAAA02041188) qui n'ont pas été intégrés dans l'assemblage. Ces trois contigs contiennent les séquences de deux copies supplémentaires : 93-NB11b et 93-NB11tps (Figure 3.12). Par analogie avec la structure du cluster chez IR64, une position est proposée pour ces contigs dans la Figure 3.12.

Enfin, d'après l'arbre construit à partir de l'alignement de CLUSTALW (Figure 3.15), de manière analogue aux LRR-kinases, les NBS-LRR seraient issus d'une copie ancestrale qui se serait dupliquée avant la séparation des indica et des japonica. Cependant, pour les copies supplémentaires NB11, il n'est pas possible de dater ces duplications. De plus, il est difficile de déterminer les orthologues de Nip-NB11. Il est probable que cet orthologue n'existe pas chez 93-11. Chez IR64, 64-NB11-X, dont nous ne possédons qu'une séquence partielle, serait l'orthologue le plus probable de Nip-NB11. D'autre part, de manière similaire aux LRR-kinases, les gènes orthologues présentent une homologie de séquence plus élevée (99 % en moyenne) que les paralogues entre eux (76% entre NB5 et les deux autres et 88% entre NB10 et NB11) (Figure 3.16 et Annexe 8).

a.3 Comparaison de la structure du locus dans différents fonds génétiques

La présence de chaque gène candidat a été vérifiée dans différents fonds génétiques par PCR. Des amorces spécifiques ont été dessinées dans chaque gène sur la base des séquences disponibles de Nipponbare et d'IR64. Ainsi la présence des différents gènes a été recherchée dans

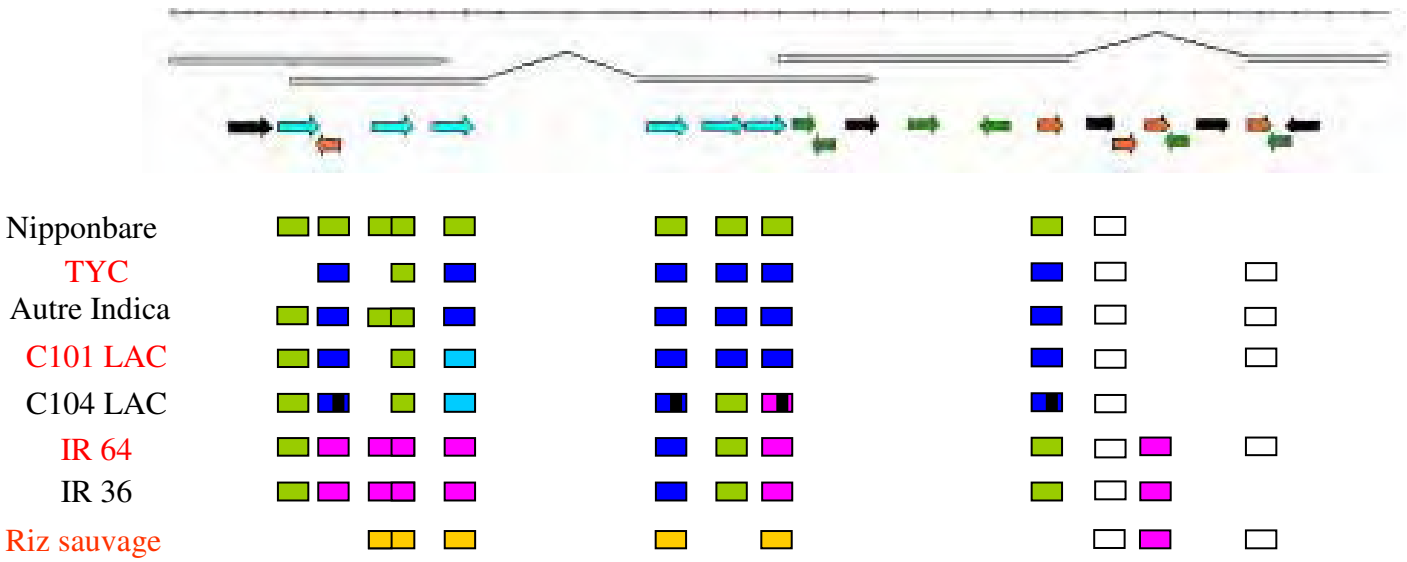


Figure 3.17. Structure comparative du locus *Pi33* dans différentes variétés.

Variétés sensibles (noir) et résistantes (rouge). La présence d'un gène est représenté par une boite, les couleurs correspondent à un polymorphisme de séquence. Lorsque les résultats d'une première PCR étaient négatifs, un deuxième jeu d'amorces était dessiné ailleurs dans le gène pour vérifier l'absence du gène. Nous avons considéré qu'un résultat de PCR positif indiquait la présence du gène.

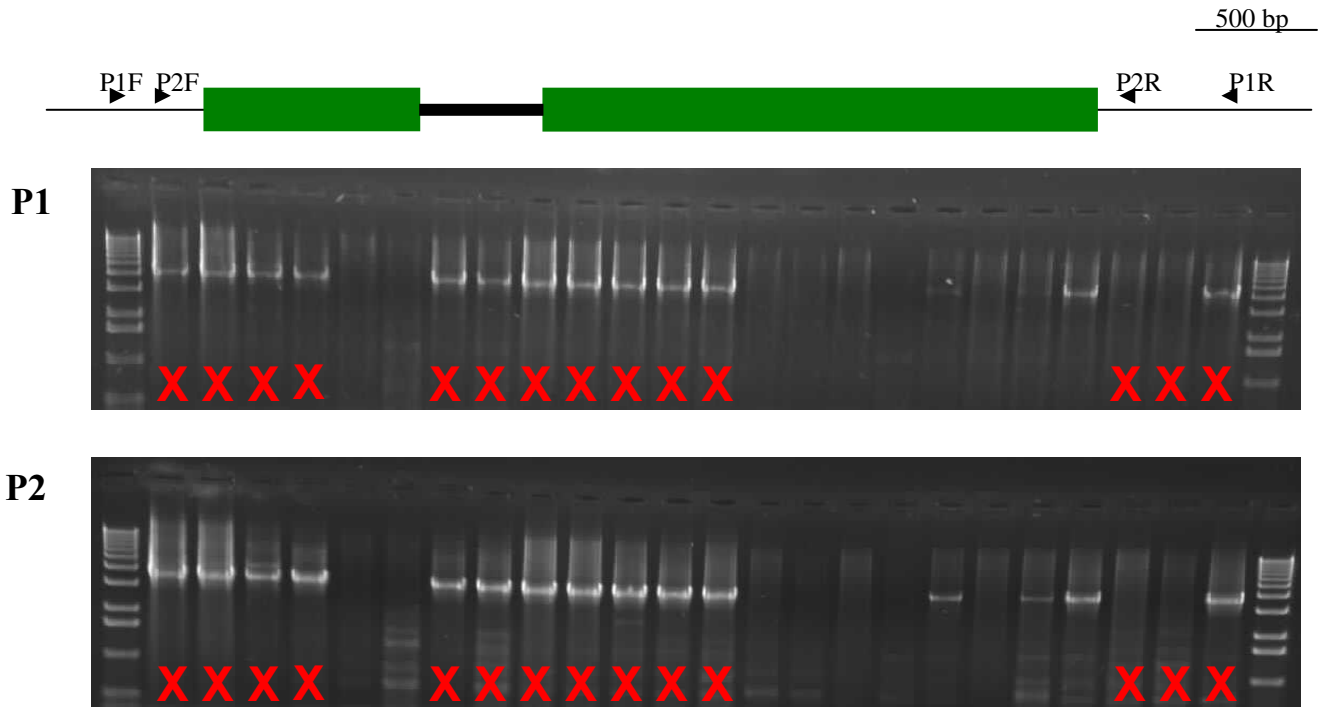


Figure 3.18. Résultats des amplifications par long-range PCR pour le gène NB11-3,5.

Les amorces utilisées sont présentées en Annexe 9. En vert, transcrit du gène 64-NB11-3,5. **X** = Variétés résistantes aux souches *Avr-Pi33*. Dans l'ordre : *O. rufipogon* IRGC 101508, ZYQ8, IR64, C101LAC, C104LAC, IR36, TYC, TN1, Bala, Kaw luyoeng, Khao Gaew, Pin Kaw, Irat7, Nipponbare, Azucena, Geb24, IR8, Latisail, Cina, Mudgo, Peta, *O. latifolia* W1184, *O. latifolia* WO542, *O. rufipogon* W1690.

Le gène s'amplifie chez toutes les variétés résistantes sauf dans les deux accessions de *O. latifolia* et chez trois variétés sensibles : Latisail, Peta et Mudgo.

huit variétés résistantes ou sensibles aux souches avirulentes *ACE1* (Figure 3.17) et sur certaines accessions d'espèces sauvages qui pourraient posséder *Pi33* (chapitre 1).

Sept des onze gènes candidats testés sont présents chez toutes les variétés de riz de l'espèce *sativa,* sensibles ou résistantes. Les quatre gènes absents ou incomplets chez certaines variétés correspondent aux copies : LRK4, LRK6, 64-NB11-4.5 et 64-NB11-3.5. Selon l'hypothèse d'une origine unique de *Pi33* chez toutes les variétés résistantes, ces 4 gènes sont de moins bons candidats car ils sont absents de certaines variétés résistantes. Cependant, dans l'hypothèse où deux gènes situés au même locus conféreraient la résistance, un gène présent uniquement dans un des haplotypes de résistance pourrait être un candidat pour *Pi33* dans cet haplotype.

Le gène 64-NB11-3.5 apparaît comme un candidat intéressant car c'est le seul polymorphisme structural Résistant/Sensible qui ait été mis en évidence. En effet, ce gène, qui peut être amplifié entièrement par PCR « long range » (Figure 3.18), s'amplifie à quelques exceptions près (les génotypes sensibles Latisail, Peta et Mudgo) uniquement chez les individus résistants.

b <u>Polymorphisme allélique des membres du cluster</u>

Afin de décrire la diversité allélique au sein du cluster *Pi33*, sept des neufs gènes candidats présents chez Nipponbare ont été partiellement séquencés (~550 bp/gène) chez différentes variétés sensibles et résistantes (Tableau 3.2). Une plus grande portion des gènes a également été séquencée chez les variétés IR36 et IR64. Le polymorphisme par rapport à Nipponbare est en moyenne de 0.74%. Ce qui est similaire à des résultats décrits dans la littérature (Yu *et al.*, 2002). Aucun gène n'est monomorphe chez toutes les variétés résistantes et polymorphes avec les variétés sensibles. De plus, le polymorphisme entre les variétés résistantes est parfois de type non synonyme. Un polymorphisme entre les deux lignées isogéniques C101LAC et C104LAC a été observé, mais seul le gène NB5 présente des mutations non synonymes (Tableau 3.2). Le gène NB5 pourrait donc être un bon candidat. Cependant, ce résultat est à tempérer par le fait qu'une faible proportion des gènes a été séquencée et suivant les gènes, la zone séquencée peut se situer ou non dans un point chaud de polymorphisme. Le fait qu'aucun polymorphisme n'ait été détecté chez les autres gènes n'en fait donc pas forcément de moins bons candidats.

De façon à permettre une comparaison plus approfondie, dix des gènes candidats ont été séquencés de manière plus complète chez trois variétés génétiquement très similaires autour de *Pi33* (Ballini et al., 2007) : IR36 (indica sensible), IR64 (indica résistant) et *Oryza rufipogon* IRGC 101508 (résistant). En moyenne, 56,4 % de la séquence des gènes a été obtenue (soit plus de 24.5 kpb au total). Ces séquences ne mettent en évidence aucun polymorphisme entre la variété

Variété	Phénotype	LRK4 (740 bp)				NB5 (525 bp)				LRK6 (232 bp)				LRK7 (591 bp)			
		Polym Nipponbare	Polym *O. rufipogon*	Polym *O. barthii*	Polym C101LAC	Polym Nipponbare	Polym *O. rufipogon*	Polym *O. barthii*	Polym C101LAC	Polym Nipponbare	Polym *O. rufipogon*	Polym *O. barthii*	Polym C101LAC	Polym Nipponbare	Polym *O. rufipogon*	Polym *O. barthii*	Polym C101LAC
Nipponbare	S	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	0.00%	1.33%	0.38%	4.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.00%	1.18%	3.89%	0.34%
Azucena	S	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.20%	1.35%	4.06%	0.17%
W542	R	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	nd	nd	nd	nd
W1184	R	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	nd	nd	nd	nd
W1574	R	7.80%	9.46%	0.00%	7.80%	2.00%	2.10%	0.00%	4.38%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	4.10%	3.38%	0.00%	3.89%
W1690	R	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	nd	nd	nd	nd	3.00%	0.43%	3.02%	3.02%	1.20%	0.17%	3.21%	1.02%
O. nivara	R	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.80%	0.00%	2.10%	2.67%	3.00%	0.00%	3.02%	3.02%	1.20%	0.00%	3.38%	1.18%
IR36	S	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.80%	0.00%	2.10%	2.67%	3.00%	0.00%	3.02%	3.02%	1.20%	0.00%	3.38%	1.18%
IR64	R	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	1.80%	0.00%	2.10%	2.67%	3.00%	0.00%	3.02%	3.02%	1.20%	0.00%	3.38%	1.18%
TYC	R	nd	nd	nd	nd	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.30%	1.18%	3.89%	0.00%
ZYQ8	R	nd	nd	nd	nd	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.20%	1.18%	3.89%	0.00%
IRAT7	R	nd	nd	nd	nd	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.20%	1.18%	3.89%	0.00%
IR1529	R	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.20%	1.18%	3.89%	0.00%
BALA	R	nd	nd	nd	nd	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.20%	1.18%	3.89%	0.00%
CINA	S	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.50%	1.18%	3.89%	0.34%
GEB24	S	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	1.00%	0.17%	3.21%	1.02%
IR8	S	nd	nd	nd	nd	4.00%	2.67%	4.38%	0.19%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	1.00%	0.17%	3.21%	1.02%
LATISAIL	S	nd	nd	nd	nd	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.80%	0.17%	3.21%	1.02%
MUDGO	S	nd	nd	nd	nd	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	1.00%	0.17%	3.21%	1.02%
PETA	S	0.14%	0.14%	9.46%	0.14%	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	1.00%	0.17%	3.21%	1.02%
C101	R	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	3.80%	2.67%	4.38%	0.00%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.30%	1.18%	3.89%	0.00%
C104	S	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	0.50%	1.14%	1.33%	3.05%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.30%	1.18%	3.89%	0.00%
CO39	S	0.00%	0.00%	9.46%	0.00%	1.00%	1.14%	1.33%	3.43%	0.00%	3.02%	0.00%	0.00%	0.30%	1.18%	3.89%	0.00%
Moyenne		0.61%	0.74%	7.28%	0.61%	2.88%	1.98%	3.26%	1.21%	nd	2.51%	0.52%	0.52%	0.78%	0.84%	3.45%	0.68%

Variété	Phénotype	LRK8 (518 bp)				LRK9b (544 bp)				NB10 (784 bp)			
		Polym Nipponbare	Polym *O. rufipogon*	Polym *O. barthii*	Polym C101LAC	Polym Nipponbare	Polym *O. rufipogon*	Polym *O. barthii*	Polym C101LAC	Polym Nipponbare	Polym *O. rufipogon*	Polym *O. barthii*	Polym C101LAC
Nipponbare	S	0.00%	0.97%	0.77%	0.77%	0.00%	0.55%	nd	0.18%	nd	0.00%	nd	0.64%
Azucena	S	0.00%	0.97%	0.77%	0.77%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W542	R	nd	nd	nd	0.00%	5.30%	7.72%	nd	7.54%	nd	nd	nd	nd
W1184	R	nd	nd	nd	0.00%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W1574	R	0.70%	1.35%	0.00%	1.54%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W1690	R	1.00%	0.77%	1.16%	1.74%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
O. nivara	R	0.80%	0.00%	1.35%	1.74%	0.40%	0.00%	nd	0.37%	0.00%	0.00%	nd	0.64%
IR36	S	0.80%	0.00%	1.35%	1.74%	0.40%	0.00%	nd	0.37%	0.00%	0.00%	nd	0.64%
IR64	R	0.80%	0.00%	1.35%	1.74%	0.40%	0.00%	nd	0.37%	0.00%	0.00%	nd	0.64%
TYC	R	0.80%	0.00%	1.35%	1.74%	0.10%	0.37%	nd	0.00%	0.64%	0.64%	nd	0.00%
ZYQ8	R	0.70%	1.74%	0.97%	0.00%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IRAT7	R	0.80%	0.77%	1.16%	1.74%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IR1529	R	0.70%	1.74%	0.97%	0.00%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BALA	R	0.70%	1.74%	0.97%	0.00%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CINA	S	0.80%	0.77%	1.54%	1.54%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GEB24	S	1.30%	1.74%	1.93%	1.93%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IR8	S	0.80%	0.77%	1.54%	1.54%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
LATISAIL	S	1.10%	1.35%	1.16%	2.12%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MUDGO	S	0.80%	0.77%	1.35%	1.35%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PETA	S	1.10%	0.97%	1.16%	2.12%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C101	R	0.70%	1.74%	1.54%	0.00%	0.10%	0.37%	nd	0.00%	0.64%	0.64%	nd	0.00%
C104	S	0.80%	0.77%	1.35%	1.74%	0.30%	0.18%	nd	0.18%	0.64%	0.64%	nd	0.00%
CO39	S	0.80%	0.77%	1.35%	1.74%	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Moyenne		0.76%	0.94%	1.20%	1.20%	0.88%	1.15%	nd	1.13%	0.32%	0.27%	nd	0.36%

Tableau 3.2. Polymorphisme de séquence (codant + non-codant) au sein des différents gènes candidats.

Le polymorphisme est calculé par rapport à la variété japonica Nipponbare, aux accessions sauvages *O. rufipogon* et *O. barthii* et à la variété indica C101LAC. En gris = données absentes, En orange polymorphisme supérieur à 1,5%. Les deux autres gènes candidats (Nip-LRK9a, Nip-NB11) n'ont pas été séquencés du fait de difficultés à obtenir des séquences spécifiques de qualité.

		Non Synonyme			Synonyme			Non Codant					
Gène	Taille (bp)	Kinase	LRR	autre	Kinase	LRR	autre		Polym Codant	Polym Non Codant	Ka/Ks Kinase	Ka/Ks LRR	Total Ka/Ks
LRK4	7598	?	?	5	?	?	7	13	0.16%	0.17%	Nd	Nd	0.71
NB5	3437	3	?	7	14	?	13	7	1.08%	0.20%	0.21	Nd	0.37
LRK6	7829	4	0	3	13	0	6	28	0.33%	0.36%	0.31	1.00	0.37
LRK7	2944	6	1	4	9	2	4	28	0.88%	0.95%	0.67	0.50	0.73
LRK8	4347	1	0	6	3	1	8	8	0.44%	0.18%	0.33	0.00	0.58
LRK9a	6483	1	0	4	3	0	7	16	0.23%	0.25%	0.33	1.00	0.50
LRK9b	7822	0	0	1	3	0	0	13	0.05%	0.17%	0.00	1.00	0.33
NB10	2768	0	?	1	3	?	3	15	0.25%	0.54%	0.00	Nd	0.17

Tableau 3.3. Polymorphisme de séquence (codant + non-codant) au sein des différents gènes candidats entre les deux variétés de référence Nipponbare et 93-11.

Les données de SNP ont été obtenues à partir de la base de données Gramene. Une distinction est faite entre les domaines kinases (=NB pour les NBS-LRR) et LRR (= LRD pour les NBS-LRR).

Gènes	Commentaire	IR64		IR36	
		24h	48h	24h	48h
64-LRK4	Non spécifique				
64-NB5	Non exprimé				
64-LRK6		++	Nd	++	Nd
64-LRK7	Non répétable				
64-LRK8		+++	+++	+++	0
64-LRK9a	Non exprimé				
64-LRK9b	Non spécifique				
64-NB10-1		+	+	+	+
64-NB10-2	ND				
64-NB11X	ND				
64-NB11tps	ND				
64-NB11-3,5		++	++	++	0
64-NB11-4,5	ND				

Tableau 3.4. Expression des gènes candidats au cours de l'infection.

L'expression des différents gènes candidats présents chez IR64 est analysée à 24h et à 48h après inoculation dans la variété résistante IR64 et dans la variété sensible IR36. Un rapport est fait entre l'expression dans une plante inoculée par rapport à l'expression dans une plante témoin non inoculée.

+++ = induction plus de trois fois supérieure au témoin, ++ = induction de 2 à 3 fois supérieure au témoin, + = induction de 1 à 2 fois supérieure au témoin, 0 = gène non différentiellement exprimé.

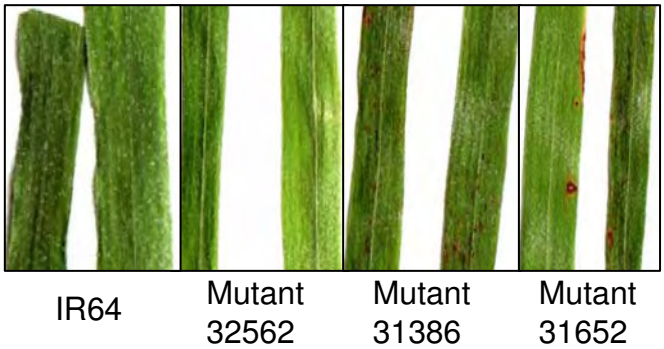


Figure 3.20. Phénotypes des mutants de la population de Tilling IR64.

sensible et les deux variétés résistantes. Cependant, tant qu'une séquence complète pour tous les gènes candidats ne sera pas disponible, il ne sera pas possible d'éliminer ou de confirmer un candidat.

Pour chacun des gènes candidats présent chez Nipponbare et 93-11, nous avons pu évaluer un rapport Ka/Ks (mutations non synonymes/mutations synonymes) qui donne un indice de la pression de sélection exercée sur chacun des gènes. En effet, une base de données des SNP identifiés entre Nipponbare et 93-11 est accessible sous Gramene. Pour chaque gène les SNP synonymes et non synonymes ont été identifiés en distinguant le domaine (LRR, Kinase, NB ou autre) dans lequel ces SNP étaient identifiés (Tableau 3.3). Tous les gènes testés présentent un rapport Ka/Ks<1, ce qui serait le signe d'une pression de sélection négative. De plus, le deuxième résultat important est que, pour les gènes de type LRR-kinases du locus, les mutations sont plus nombreuses dans le domaine kinase que dans le domaine LRR. Ce dernier est pourtant connu pour être hypervariable dans les familles de gènes de résistance (voir ci-dessus paragraphe III-1-1-b). Ce résultat pourrait, soit indiquer que les gènes du cluster subissent une pression de sélection faible, soit que la pression de sélection n'est pas positive comme attendu pour le modèle « birth and death ». Cette deuxième hypothèse confirmerait que les LRR-kinases du cluster sont de moins bons candidats. De plus, cela indique que ces gènes pourraient jouer un rôle important pour la plante puisqu'ils sont très conservés. En effet, ils ont été maintenus dans les deux sous-espèces et dans l'espèce sauvage *O. rufipogon* (si l'on considère la séquence IR64 comme un équivalent de *O. rufipogon*).

Un rapport Ka/Ks a également été calculé entre les copies 93-NB11b et 64-NB11-3,5 supposées orthologues. Le rapport est supérieur à 1 (28 mutations non synonymes pour 10 mutations synonymes soit 2,8) et les mutations non synonymes sont toutes situées dans le domaine LRD (équivalent au domaine LRR). Contrairement aux autres gènes du cluster, ce gène pourrait donc subir une pression de sélection positive.

c <u>Polymorphisme d'expression des membres du cluster</u>

L'étude de l'expression des RGA du cluster a posé un certain nombre de problèmes. En effet, nous ne disposons pas toujours de la séquence d'un cDNA prédit correcte et ces gènes ont une homologie élevée. Il est donc très difficile de définir des amorces à la fois spécifiques et de bonne qualité. Ainsi, pour quatre des gènes, nous n'avons pas pu dessiner d'amorces spécifiques (NB10-2, NB11-tps, NB11-X et NB11-4,5) et malgré plusieurs définitions d'amorces différentes (souvent en 3' UTR), deux des gènes testés ne s'amplifient pas de manière spécifique (LRK4 et LRK9b) (Tableau 3.4). Pour le gène LRK7 l'amplification présente une mauvaise efficacité.

L'expression de six gènes a pu être étudiée de manière satisfaisante à 24h et à 48h après inoculation dans une variété sensible (IR36) et une variété résistante (IR64) (Tableau 3.4). Quatre gènes (LRK6, LRK8, NB10-1 et NB11-3,5) sont induits lors de l'infection dans les deux variétés. A 48h, les gènes LRK8 et NB11-3,5 ne seraient induits que dans la variété résistante. Deux gènes (NB5 et LRK9a) ne sont pas détectés, et ne semblent donc pas s'exprimer, même chez un témoin non inoculé. Ce résultat éliminerait ces deux gènes comme candidats pour *Pi33*.

III.2.3 Clonage de Pi33

L'un des objectifs de cette thèse est d'identifier et de cloner le gène de résistance *Pi33*. Deux approches ont été utilisées en parallèle pour atteindre cet objectif : le criblage de banques de mutants et la complémentation de variétés sensibles avec des portions d'ADN génomique de la variété résistante IR64 correspondant à la zone de *Pi33*.

a <u>Clonage de *Pi33* par analyse de mutants</u>

Deux collections de mutants ont été exploitées : des mutants EMS de C101LAC disponibles au laboratoire et des mutants diepoxybutane d'IR64 disponibles à l'IRRI. Deux méthodes différentes ont permis de cribler ces collections : un criblage phénotypique direct des mutants EMS, et un criblage par tilling sur la collection de mutants d'IR64.

a.1 Criblage d'une banque de mutants d'IR64 par TILLING

Une population de 2 079 mutants diepoxybutane issus de la variété indica résistante IR64 (Wu *et al.*, 2005) a été criblée par TILLING à l'IRRI par Geethanjali Subramaniam dans l'équipe d'Hei Leung. Le criblage par TILLING permet de mettre en évidence une mutation par rapport au parent sauvage dans une séquence donnée. Les NBS-LRR de la fin du locus étant considérés comme les meilleurs candidats, trois amorces ont été dessinées et ciblent 500 bp dans trois copies différentes : 64-NB11-4,5, 64-NB11-3,5 et 64-NB11-X. Trois mutants ont ainsi été identifiés. Seulement un seul de ces mutants présente une mutation entraînant un changement d'acide aminé (un acide Aspartique à la place d'une Asparagine). Ce mutant est muté dans le domaine ARC du gène 64-NB11-3,5. Ces mutants ont ensuite été testés pour leur résistance en utilisant une souche de *M. oryzae* possédant le gène *Ace1*. Les trois mutants ont un phénotype sauvage (résistant) (Figure 3.20). Ce résultat était attendu pour les deux mutants porteurs de mutations silencieuses. L'absence de changement de phénotype pour une mutation provoquant un changement d'acide aminé, n'est pas suffisante pour éliminer NB11-3.5 de la liste des candidats. En effet, il est prévisible que certaines mutations n'auront pas d'effet majeur sur la fonction et la structure de la protéine Pi33. Un nombre de mutants plus important pourrait probablement

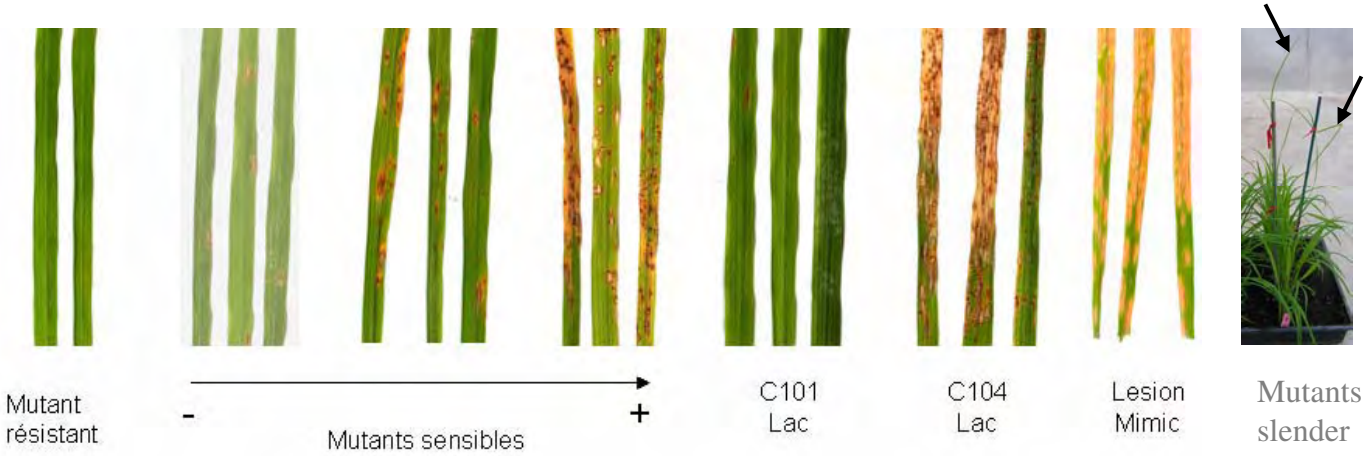


Figure 3.21. Phénotypes observés lors du crible de la banque de mutants C101LAC.

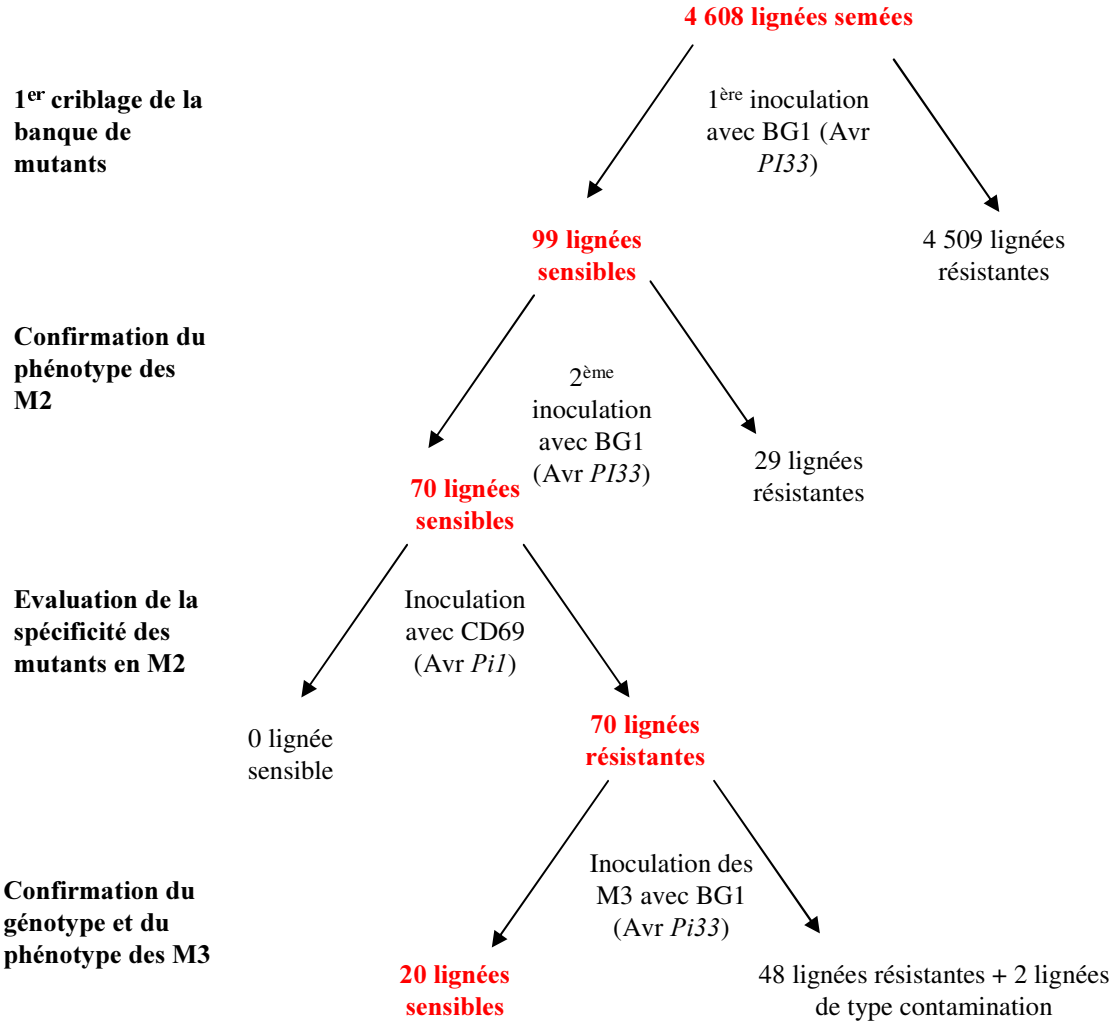


Figure 3.22. Bilan du criblage de la banque de mutants C101LAC.

```
          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                775        785        795        805        815
C101      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
3574      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
3576      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
4629      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
5212      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
5254      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
5287      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
5424      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
5426      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAATCCCTAT
5427      ACCCGTCACC TCCCAATAAC GGTTTTGCTC AGGTTGTATC AAACCCCTAT
```


Figure 3.23. Polymorphisme de séquence dans le mutant 5426

03M23	Nb transfo	Nb clones	Nb Albinos	Nb vérifiés	Nb confirmés
Co25	2	3	0	2	0
Co39	2	3	0	0	0
IR8	1	1	0	1	0
MTU9	12	16	1	6	0
Nipponbare	10	23	1	5	0
Som Caw	13	33	0	6	0
Total	40	79	2	20	0
03M23-2	**Nb transfo**	**Nb clones**	**Nb Albinos**	**Nb vérifiés**	**Nb confirmés**
Nipponbare	19	42	0	6	0
Som caw	6	16	0	4	0
Total	25	58	0	10	0
03M23-6	**Nb transfo**	**Nb clones**	**Nb Albinos**	**Nb vérifiés**	**Nb confirmés**
Nipponbare	14	31	3	10	0
Total	14	31	3	10	0
33B02	**Nb transfo**	**Nb clones**	**Nb Albinos**	**Nb vérifiés**	**Nb confirmés**
Co25	5	9	0	3	0
Co39	2	3	0	1	0
MTU9	7	12	0	4	0
Nipponbare	22	43	1	5	0
Som Caw	10	15	0	5	0
Total	46	82	1	18	0
TOTAL	**125**	**250**	**6**	**58**	0

Tableau 3.5. Bilan des complémentations de clones BAC entiers.

O3M23, O3M23-2 et O3M23-6 correspondent à différentes constructions du clone BAC O3M23. Plusieurs génotypes ont été testés. Pour chaque génotype plusieurs transformations indépendantes ont été tentées qui ont permis d'obtenir plusieurs clones *in vitro*. La colonne « Nb vérifiés » correspond au nombre de plantes testées par PCR pour vérifier la présence de l'insert. La colonne « Nb confirmés » correspond au nombre de plantes possédant un insert.

permettre de conclure mais implique de cribler de nouveaux la banque avec d'autres couples d'amorce spécifiques situés dans ce gène. Par ailleurs, un criblage de la banque pour des mutations dans les autres gènes candidats viendrait compléter utilement ce travail.

a.2 Criblage phénotypique d'une banque de mutants de C101LAC

Une population de mutants EMS (Ethyl Methane Sulfonate) de la variété résistante indica C101LAC a été créée au sein du laboratoire, en collaboration avec Bayer Crop Science, dans le cadre du projet Génoplante RiceTill. Quatre mille six cebt huit lignées ont été criblées pour la résistance à une souche avirulente vis-à-vis de *Pi33* et des mutants sensibles ont été identifiés (Figure 3.21). Le travail de criblage et de caractérisation de la population de mutants C101LAC a été effectué en partie par Cyrille ZINI, stagiaire de Master Professionnel II. Quatre vingt dix neuf lignées (2%) présentent un phénotype plus sensible que le phénotype sauvage de C101LAC. Une deuxième inoculation a permis de confirmer le phénotype de soixante dix de ces lignées (Figure 3.22). Les vingt neufs lignées non confirmées correspondent, généralement, à des lignées qui ne présentaient que quelques lésions lors de la première inoculation.

La variété C101LAC présente plusieurs gènes de résistance dont deux ont été identifiés : *Pi1* et *Pi33*. Pour tester l'hypothèse que certains des phénotypes observés seraient dus à une mutation dans un gène situé en aval de ces deux gènes de résistance, une troisième inoculation faisant intervenir une souche avirulente pour le gène *Pi1* a été réalisée. Les soixante dix lignées sensibles à la souche avirulente pour *Pi33*, se sont révélées résistantes à cette deuxième souche. Ce résultat indique que les mutations observées sont spécifiques de la voie de signalisation de *Pi33*.

Les soixante dix lignées ont été autofécondées pour obtenir une génération M3. En génération M3, vingt des soixante dix lignées ont pu être confirmées comme étant plus sensibles que le témoin C101LAC (soit 0.4 % du total des lignées testées). Parmi ces vingt mutants, sept présentent une sensibilité très marquée par rapport au phénotype sauvage C101LAC (Figure 3.22). Les 13 autres lignées n'étant que légèrement plus sensibles par rapport au phénotype sauvage C101LAC, les neufs mutants très sensibles ont été caractérisés en priorité.

La recherche de mutations dans les gènes candidats a été initiée par la caractérisation du gène 64-NB11-3.5 qui semblait un bon candidat d'après les résultats de polymorphisme de structure. Au total, 2,7 kb de séquences sur les 3,3 kb du gène ont été obtenues et comparées avec celles de C101LAC pour les neuf mutants. Seul le mutant 5426 présente un polymorphisme de type SNP : C muté en T (Figure 3.23). Cependant, cette mutation n'entraîne pas de changement d'acide aminé. Cette mutation ne peut donc pas avoir d'impact sur le phénotype.

En ayant séquencé en moyenne 80 % du gène, aucune mutation susceptible de modifier le phénotype n'a pu être détectée. Deux hypothèses peuvent donc être envisagées. La première hypothèse est que 64-NB11-3.5 est bien *Pi33* mais que les mutations sont dans la partie non séquencée. La deuxième hypothèse est que ce candidat n'est pas *Pi33*. Des expérimentations sont en cours pour compléter le séquençage du gène 64-NB11-3.5 et rechercher le polymorphisme de ces mutants dans les autres gènes candidats. La technique de Tilling étant actuellement mise au point au laboratoire, il pourra être envisagé d'utiliser cette technique directement sur les neuf mutants identifiés pour tous les candidats. Cette alternative pourrait être moins coûteuse que le séquençage.

b Clonage de *Pi33* par complémentation

En parallèle, la complémentation de variétés sensibles par des clones BAC entiers a été tentée. Cette stratégie sans à priori sur les gènes responsables de la résistance, devait permettre d'affiner la cartographie de *Pi33* à un seul clone BAC. Un sous-clonage sur les deux clones BAC situés en fin de cluster et contenant les copies de NB11 a aussi été initié. Cette stratégie présente l'avantage que tous les gènes présents dans ces clones BAC seront testés. Enfin, un clonage de gènes candidats est en cours.

Les deux clones BAC (03M23 et 33B02) ont été complémentés dans la variété Nipponbare ainsi que dans plusieurs variétés indica (IR8, Co39, Som Kaw) avec le vecteur pTAC37 (Tableau 3.5). Les ADN de ces plantes ont permis de tester la présence des inserts par PCR. Des marqueurs situés dans cette zone et polymorphes entre IR64 et la variété transformée permettaient de vérifier en cas d'amplification positive la présence de l'insert (Annexe 14). Tous les résultats indiquent qu'aucune des plantes transformées avec les clones BAC 33B02 et 03M23 n'a d'insert. Ce résultat peut sans doute s'expliquer par la taille des fragments à transformer (supérieurs à 60 kb) qui rendent la complémentation plus difficile. Ainsi, même la variété Nipponbare qui pourtant se transforme assez facilement a eu des rendements au moins quatre fois inférieurs à ceux habituels.

Par la suite, une stratégie de sous-clonage des clones BAC 33B02 et 44H23 a été initiée dans le vecteur pCAMBIA 5300. En théorie, ce plasmide permet le clonage de fragments de 15-20 kb. Cependant, les résultats nous montrent que la taille maximum du fragment d'ADN qui peut être clonée dans pCAMBIA 5300 est d'environ 7 kb. Or, les gènes que nous souhaitons cloner étant situés dans des séquences de 16 et 20 kb, ce vecteur s'est avéré être inadapté pour notre clonage. Un autre vecteur pRTAC8, déjà utilisé dans les clonages de gros fragments (Qu *et al.*, 2003 ; Qu *et al.*, 2006) est en cours d'essai au laboratoire.

Enfin, une stratégie de clonage des gènes entiers après PCR « long-range » de différents candidats a également été initiée. Des amorces ont été dessinées autour des principaux gènes candidats (copies de NB11) afin de les amplifier par PCR « long-range » et de les insérer dans le vecteur pCAMBIA 2300 Overexpress qui possède un promoteur inductible. Cette stratégie est toujours en cours de mise au point au laboratoire.

III.3 Discussion

III.3.1 Structure et diversité au sein du cluster de *Pi33*

a De légères déviations de la colinéarité

Les résultats de séquençage mettent en évidence une bonne colinéarité entre les trois accessions qui appartiennent pourtant à trois groupes génétiques très différents : les deux sous-espèces indica et japonica d'*O. sativa* et *O. rufipogon* (puisque dans cette zone, le génome d'IR64 provient d'une accession de cette espèce). Cependant, cette colinéarité est moins conservée si on considère le nombre de RGA. En effet, les LRR-kinases et les NBS-LRR semblent être en extension chez 93-11 et IR64 par rapport à Nipponbare. Un nombre de copies très variable entre génotypes est courant dans les clusters de gènes de résistance. Par exemple, chez le riz, au locus *Pi2/Pi9* le nombre de copies de NBS-LRR varie entre 4 et 9 (Zhou et *al.*, 2007). Une analyse de la micro colinéarité entre les variétés de riz Nipponbare et 93-11 avait déjà démontré qu'elle n'était pas toujours conservée (Han et Xue, 2003). Dans le cas de *Pi33*, la présence de nombreux éléments transposables dans la zone pourrait expliquer en partie cette variabilité. En effet, en s'insérant les transposons peuvent entraîner une délétion d'une portion de génome. De plus, la présence de deux copies très similaires de transposons peut faciliter les phénomènes de duplications par crossing-over inégaux et les mutations au sein des gènes (Kumar et Bennetzen, 1999).

b Un cluster ancien régi par le modèle « birth and death ».

Des duplications suivies d'une divergence seraient les phénomènes qui aboutissent à la formation d'un cluster (Michelmore et Meyers, 1998). L'une des hypothèses du modèle « birth and death » d'évolution des clusters de gènes de résistance est que les paralogues sont plus divergents que les orthologues. Au locus de *Pi33*, l'homologie entre orthologues chez différentes variétés est plus forte qu'entre paralogues chez une même variété, ce qui laisse penser que le locus de *Pi33* est régi par les lois du modèle « birth and death ».

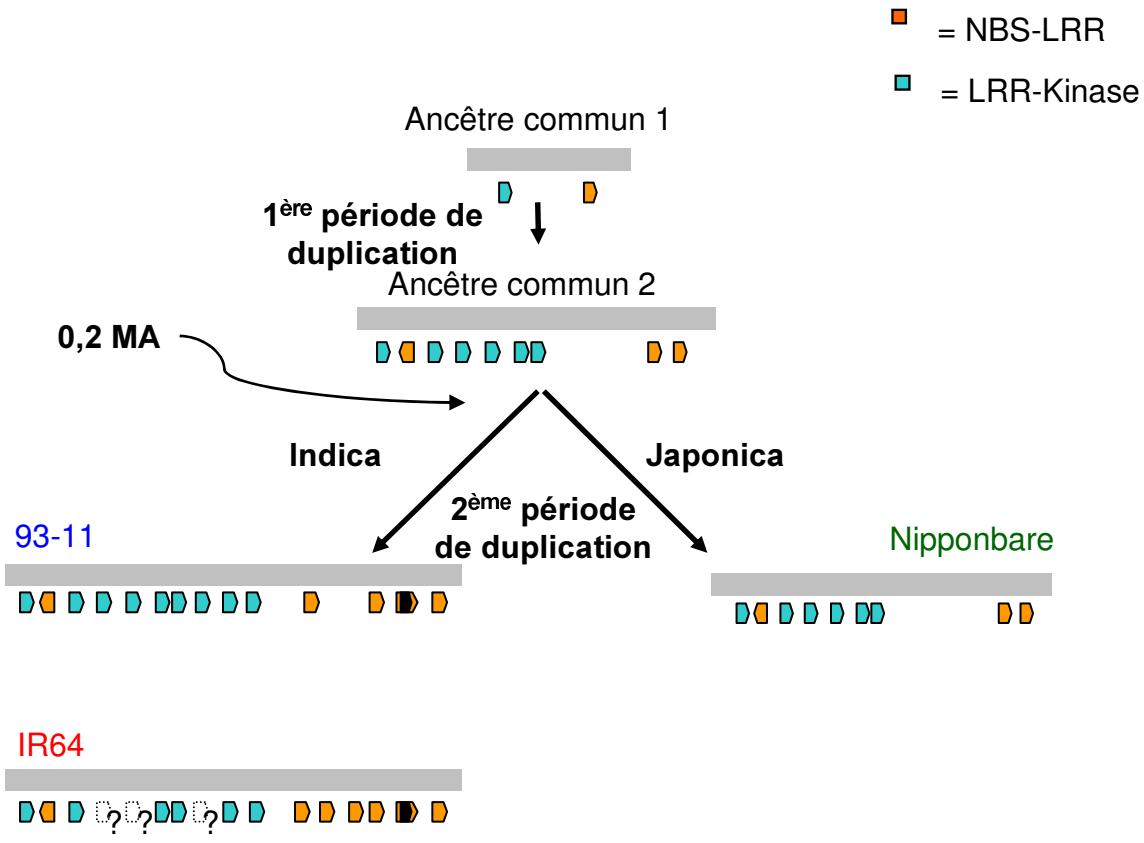


Figure 3.24. Hypothèse d'évolution des analogues de gène de résistance du locus *Pi33*.

Une première période de duplication aurait eu lieu chez l'ancêtre commun des indica et des japonica, ce qui aurait permis la formation du cluster. Puis des duplications plus récentes auraient eu lieu dans une deuxième période chez les indica.

Le degré d'homologie de séquence au sein d'une variété peut être un indice de l'âge du cluster. L'analyse des homologies de séquence entre les gènes candidats au locus de *Pi33* met en évidence deux classes : une classe de paralogues avec une diversité importante et une classe de paralogues très conservés (93-LRK7/93-LRK7b, 93-LRK8/93-LRK8b, 93-NB11a/93-NB11b et 64-NB11-3,5/64-NB11-4,5). Si le taux de mutation et/ou de recombinaison est constant entre les différents gènes candidats, les deux classes de paralogues pourraient être l'indice que le cluster est ancien (avant la séparation des deux sous-espèces indica et japonica) et qu'il a subi deux périodes de duplication. Une période ancienne qui aurait abouti à la formation de tous les paralogues divergents, qui auraient ensuite divergé, et une période plus récente qui aurait abouti à la création des copies les plus similaires (Figure 3.24).

c Des domaines LRR conservés

Un autre résultat du modèle « birth and death », observé dans plusieurs cas est que les domaines LRR sont soumis à de fortes pressions de sélection, en particulier au niveau de leurs résidus exposés (Mondragon-Palomino *et al.*, 2002 ; Kuang *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2006). Au locus *Pi33*, il est possible de comparer pour chaque gène du cluster la séquence de Nipponbare et de 93-11. Cette analyse met en évidence que dans les LRR-kinases du cluster, le domaine kinase subit une pression de sélection plus forte que le domaine LRR car la plupart des mutations se situent dans ce domaine (43 mutations dans le domaine kinase contre 4 dans le domaine LRR entre Nipponbare et 93-11). Cette analyse met en évidence que, contrairement à ce qui est observé au locus *Xa21* ou *Xa26*, les LRR-kinases du cluster ne subissent pas de pression positive au niveau de leur domaine LRR. Ce résultat confirme que les LRR-kinases sont de moins bons candidats pour *Pi33*. Dans le cas des NBS-LRR, nous n'avons pas pu procéder à une analyse du domaine « LRR » car il est peu conservé. Cependant, lorsque les copies 93-NB11b et 64-NB11-3,5 sont comparées, le rapport Ka/Ks est de 2,8 et les mutations non synonymes semblent se concentrer dans le domaine LRD. Ce gène subirait donc une pression de sélection positive.

Une carte physique de *Pi33* est ainsi disponible dans la variété résistante IR64 ainsi que dans huit autres accessions. Le séquençage du cluster de NBS-LRR est en cours dans des espèces sauvages et des génotypes indica sensibles. A terme, l'ensemble de ces données permettra de donner une image plus complète de l'évolution du locus de *Pi33*.

Gènes	Polymorphisme Présence / absence						Polymorphisme de séquence		
	C101LAC	C104LAC-Co39	IR64 - O Rufi R	IR36	TYC-TN1-Bala	Indica S	C101Lac vs C104Lac-Co39	IR64 - O Rufi R vs IR36	TYC-TN1-Bala vs Indica S
64-LRK4	+	+	+	+	-	+	-	-	-
64-NB5	+	+	+	+	+	+	+	-	-
64-LRK6	-	-	+	+	-	+	-	-	-
64-LRK7	+	+	+	+	+	+	-	-	+
64-LRK8	+	+	+	+	+	+	+	-	+
64-LRK9a	+	+	+	+	+	+	ND	-	ND
64-LRK9b	+	+	+	+	+	+	+	-	ND
64-NB10-1	+	+	+	+	+	+	-	-	ND
64-NB10-2	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
64-NB11X	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
64-NB11tps	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
64-NB11-3,5	+	-	+	-	+	-	ND	-	ND
64-NB11-4,5	-	-	+	+	-?	ND	ND	-	ND

Gènes	Expression	Conservation séquence entre toutes les variétés R	Bilan si 1 seul gène	Bilan si plusieurs gènes
64-LRK4	ND	-	-	+
64-NB5	-	+	-	-
64-LRK6	+	+	-	+
64-LRK7	ND	+	+	+
64-LRK8	+	+	+	+
64-LRK9a	-	ND	-	-
64-LRK9b	ND	+	+	+
64-NB10-1	+	+	+	+
64-NB10-2	ND	ND	ND	ND
64-NB11X	ND	ND	ND	ND
64-NB11tps	ND	ND	ND	ND
64-NB11-3,5	+	+	+	+
64-NB11-4,5	ND	ND	-?	+

Tableau 3.6. Bilan sur la sélection de gènes candidats pour *Pi33*.

Le polymorphisme de structure est indiqué par un + si le gène est présent et un – pour l'absence. Le polymorphisme allélique est indiqué par un + en cas de polymorphisme et un – en absence de polymorphisme. Le polymorphisme d'expression est indiqué par un + si le gène est exprimé et un – si le gène n'est pas exprimé. Dans les colonnes bilan le – indique que le gène n'est pas un bon candidat et le + que rien ne permet de rejeter ce gène comme candidat.

III.3.2 Clonage de *Pi33*

a Identification de gènes candidats pour *Pi33*

Pour préparer le clonage de *Pi33*, les gènes candidats ont été analysés sur trois niveaux afin d'éliminer ou de mettre en évidence certains candidats (Tableau 3.6). Cependant, l'analyse du locus *Pi33* est compliquée par le fait que l'hypothèse que deux gènes différents sont à l'origine de la résistance dans deux variétés différentes ne peut être exclue (chapitre 1).

L'analyse de l'expression des gènes candidats permet d'éliminer les gènes qui ne sont pas exprimés au cours de l'infection : NB5 et LRK9a. Les quatre autres gènes dont l'expression a pu être mesurée (LRK6, LRK8, NB10 et NB11 Tableau 3.4) sont tous induits au cours de l'infection chez les individus résistants et les individus sensibles.

L'analyse de la structure des LRR-kinases indique qu'il s'agit de LRR-kinases de type RD qui ne jouent habituellement pas de rôle dans la résistance. De plus, ces LRR-kinases contrairement aux LRR-kinases ayant un rôle dans la résistance présentent un polymorphisme très faible dans leur domaine LRR. Bien qu'il ne soit pas exclu qu'une des LRR-kinases soit *Pi33* et qu'elle agisse en synergie avec un autre gène (à la manière de *Pto* avec *Prf*), ces arguments sont en faveur du fait que *Pi33* serait une des NBS-LRR.

Le polymorphisme de structure indique que certains gènes sont probablement absents de certaines variétés résistantes (LRK4, LRK6, NB11-4.5). Si l'hypothèse d'un gène unique pour *Pi33* est retenue alors ces trois candidats doivent être éliminés. Sinon, ces gènes restent des candidats dans les haplotypes où ils sont présents. La copie NB11-3,5 semble être un bon candidat car c'est la seule copie qui présente une corrélation entre présence du gène et résistance et absence du gène et sensibilité, à trois exceptions près.

L'analyse de polymorphisme allélique n'a pas permis d'identifier un candidat intéressant car aucune corrélation entre polymorphisme et résistance/sensibilité n'a pu être identifiée. Cependant, parmi les gènes candidats, deux gènes se distinguent par un polymorphisme différent de la normale : NB5 et NB11. Le gène NB5 présente un polymorphisme élevé (1,2% en comparant la séquence de Nipponbare avec les séquences chez 93-11, IR64 ou IR36). C'est également le seul gène pour lequel nous ayons détecté un polymorphisme non synonyme entre les deux lignées isogéniques C101LAC et C104LAC. Ce résultat est surprenant pour un gène qui ne semble pas fonctionnel puisqu'il ne s'exprime pas. Enfin, un polymorphisme élevé (1,3%) est détecté entre 64-NB11-3,5 et 93-NB11b. Cette analyse confirme que ce gène est un bon candidat.

Pour conclure, l'analyse de la diversité au sein du cluster semblerait indiquer que les copies de NBS-LRR et notamment NB11-3,5 seraient de meilleurs candidats que les LRR-kinases

sauf NB5 qui ne s'exprimerait pas. Nous avons donc focalisé en priorité les efforts de clonage sur la partie terminale du cluster où sont localisés les NBS-LRR.

b Clonage de *Pi33* par analyse de mutants

Sur 4 608 lignées testées, 20 sont potentiellement des mutants de *Pi33*. Il est possible d'envisager, qu'en plus de *Pi33*, d'autres gènes, impliqués dans la résistance déclenchée par *Pi33*, soient mutés. Cependant, la plupart des gènes de résistance clonés donnent des mutants au phénotype assez clair. Des mutations dans les gènes en aval de *Pi33* conduiraient probablement à des phénotypes moins marqués que ceux observés. De plus, dans les autres cas ou cette stratégie de criblage de mutants a été mise en place, la très grande majorité des mutations étaient dans le gène de résistance et pas dans les voies de signalisation (*Rpm1* ; Tornero *et al.,* 2002).

A ce stade, seul le gène candidat NB11-3,5 a été caractérisé pour ces mutants. Aucune mutation n'a pu être détectée alors que 80 % du gène a été séquencé. Cependant, il n'est pas exclu que les mutations puissent se concentrer dans une zone relativement limitée du gène. En effet, dans le cas du gène *SLR1* du riz par exemple, la majorité des mutations se concentrent dans une région de 200 pb (Ikeda *et al.*, 2001). Dans le cas de NB11-3,5, le premier exon du domaine NB n'a pas été séquencé. Or, ce domaine est plus susceptible de renfermer des mutations conduisant à une perte de fonction de la protéine.

Notre objectif est donc, dans un premier temps, de compléter la séquence du candidat NB11-3,5. Dans l'hypothèse ou aucun polymorphisme ne serait observé pour le gène NB11-3,5, il sera nécessaire de séquencer entièrement d'autres candidats. Cependant, comme cette technique est coûteuse, il est également envisagé de cribler les différents gènes candidats par Tilling sur les mutants identifiés. Cette technique est en cours de mise au point au laboratoire.

c Clonage de *Pi33* par complémentation

Le cluster de *Pi33* a été cartographié physiquement dans une variété résistante (IR64). La cartographie dans la variété IR64 sera complétée par le séquençage (en cours) de trois clones BAC supplémentaires. Ils permettront de compléter la séquence du locus de *Pi33* définie par la cartographie génétique en fournissant la séquence du cluster des LRR-kinases ainsi qu'une partie du cluster des NBS-LRR au niveau du gène 64-NB10. Dans un premier temps, il s'agira de vérifier que nous disposons de la totalité de la séquence du locus. Dans le cas contraire, il faudra envisager de séquencer les portions manquantes. L'utilisation d'une stratégie par PCR est envisageable pour des trous de petite taille. Ensuite, ces clones BAC vont pouvoir être utilisés pour complémenter une variété sensible avec l'ensemble du locus.

La stratégie de clonage par PCR « Long-range » devrait permettre d'aboutir plus rapidement à l'obtention des clones utilisables en transformation. Cependant, cette technique nécessite de s'appuyer sur une séquence de qualité pour dessiner des amorces, et ne pourra donc être pleinement envisagée que lorsque nous posséderons la séquence complète du locus chez IR64. De plus, cette stratégie peut se révéler certes plus rapide, mais présente des risques dont le principal est de ne pas avoir identifié tous les candidats potentiels.

La stratégie basée sur la complémentation ne nécessite pas d'identifier les candidats (même si connaître les candidats peut simplifier le travail). A ce jour, les différentes stratégies de clonage de *Pi33* ont été infructueuses mais, les résultats obtenus ont permis de mettre en place une stratégie qui devrait aboutir à des résultats dans les mois qui viennent. Comme dans un premier temps nous ne disposions que d'une partie des clones BAC d'IR64 correspondant au locus de *Pi33* et que seulement trois d'entre eux sont séquencés, nous avons axé le sous-clonage sur la partie terminale du cluster qui présente les copies de NB11. L'extension de la stratégie de sous-clonage à tous les clones BAC de la zone permettra de tester tous les gènes candidats. Bien que cette stratégie soit longue, laborieuse et nécessite la production d'une grande quantité de matériel végétal, elle paraît la plus adaptée pour cloner *Pi33*.

III.4 Conclusion et perspectives

Nous avons donc pu cartographier physiquement *Pi33* dans trois variétés représentant les deux sous-espèces de riz cultivés : indica et japonica. Cette cartographie a mis en évidence des écarts à la colinéarité entre ces trois variétés au niveau du locus de *Pi33*. Cette cartographie met également en évidence une histoire évolutive complexe du cluster avec plusieurs périodes différentes de duplication. Ainsi, de nombreuses copies de gènes candidats sont présentes dans la zone avec de fortes homologies de séquence. Cette structure en cluster ne favorise pas le travail de clonage. Ce travail devait permettre de mettre en évidence des candidats sur lesquels accentuer le clonage. Les NBS-LRR du cluster ressortent ainsi comme des candidats plus probables pour *Pi33*. Des complémentations sont en cours pour ces candidats. D'autre part, plusieurs mutants ont été mis en évidence dont la caractérisation pour ces gènes candidats est en cours. L'analyse des mutants et la complémentation par sous-clonage sont prioritaires.

III.5 Matériels et Méthodes :

III.5.1 Cartographie de *Pi33* et caractérisation du cluster

a Matériel végétal

Pour la cartographie génétique trois populations de descendants ont été utilisées. Elles sont issues de croisements entre IR64, variété améliorée de riz *indica* demi-naine obtenue à l'IRRI et Azucena, variété traditionnelle *japonica* tropicale. La présence de *Pi33* chez IR64 a été démontrée (Berruyer *et al.*, 2003 ; Ballini *et al.*, 2007). La variété Azucena est sensible.

La première population utilisée est constituée de 105 lignées haploïdes doublées (HD) issues d'une F_1 IR64 × Azucena réalisées et génotypées grâce à une collaboration entre le CIRAD, l'IRD et l'IRRI (Guiderdoni *et al.*, 1992 ; Guiderdoni *et al.*, 2006). Dans le cadre du projet EGRAM, deux autres populations du même croisement ont été créées : 500 lignées HD et 284 lignées *single seed descent* (SSD). Sur ces 784 lignées, 767 ont été caractérisées pour différents marqueurs microsatellites situés à proximité de *Pi33*. Sept de ces lignées présentent un allèle non parental pour l'un au moins de ces marqueurs. Sept cent soixante lignées sont donc utilisables dans cette étude. Vingt-neuf lignées recombinantes au niveau du locus de *Pi33* ont été conservées pour une caractérisation plus poussée.

b Données génomiques

A partir de la position génétique de *Pi33*, une position physique a pu être établie *in silico* dans les deux variétés de riz sensibles séquencées : la variété japonica Nipponbare (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) et la variété indica 93-11 (Zhao *et al.*, 2004).

Une cartographie physique de *Pi33* a été établie dans la variété japonica sensible Nipponbare. L'annotation a été faite sur la base des annotations automatiques proposées par les bases de données TIGR (http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/index.shtml) et RiceGAAS (http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/). La cartographie physique de *Pi33* dans la variété indica sensible 93-11 a été établie en utilisant les séquences assemblées (Superscaffold) disponibles dans la base de données BGI-RIS (http://rise.genomics.org.cn/rice/index2.jsp). Les contigs issus de cette base de données ont également été criblés par BLAST avec la séquence du gène Nip-NB11 afin de mettre en évidence de nouvelles copies de NB11 chez 93-11. L'annotation de 93-11 a été faite sur la base de l'annotation automatique proposée dans la base de données OrygenesDB (http://orygenesdb.cirad.fr/index_fr).

c Criblage des banques BAC

Neuf banques BAC ont été exploitées pour identifier des clones BAC candidats couvrant le locus de *Pi33* (Annexe 11).

La variété IR64 n'a pour l'instant pas été séquencée, cependant une banque BAC est disponible contenant 18 432 clones représentant 3,28 génomes (Yang *et al.*, 1997). Dans un premier temps, cette banque a été criblée par hybridation de membranes à ADN en utilisant des sondes correspondant à des amplifications de certains des gènes candidats. Ces amplifications avaient été obtenues à partir de l'ADN d'IR64 en utilisant des amorces définies sur la base de la séquence disponible chez Nipponbare (Annexe 11). Dans un second temps, la même banque a été criblée par PCR sur les clones à partir de cultures disponibles à l'IRD (Annexe 11).

Une banque BAC est disponible dans une autre variété indica sensible (Kasalath ; Katagiri *et al.*, 2004). Les extrémités de ces clones BAC ont été séquencées et sont disponibles *in silico* sur Internet (http://rgp.dna.affrc.go.jp/blast/runblast.html). Plusieurs banques BAC ont été construites à partir des ADN de plusieurs espèces sauvages produits dans le cadre du projet OMAP (Oryza Map Alignment Project ; Wing *et al.*, 2005 ; Ammiraju *et al.*, 2006). Les extrémités de ces clones BAC ont été séquencées et sont disponibles *in silico* sur Internet (http ://www.genome.arizona.edu/stc/rice/). Ces huit banques ont donc été criblées par BLAST en utilisant des séquences du cluster chez Nipponbare. Vingt-cinq clones BAC candidats correspondant au locus de *Pi33* ont ainsi été identifiés (Figure 3.11).

d Séquençage, assemblage et annotation des clones BAC

Douze clones BAC ont été sélectionnés pour être séquencés par shotgun : six clones BAC couvrant la zone du cluster chez IR64, deux clones BAC couvrant la zone du cluster chez Kasalath et quatre clones BAC couvrant la fin du cluster au niveau des copies de NBS-LRR chez *O. glaberrima* IRGC 96717, *O. rufipogon* IRGC 105491, *O. punctata* IRGC 105690 et *O. brachyanta* IRGC 101232 (Annexe 11). Deux clones BAC (03M23 et 33B02) de la variété IR64 ont été séquencés par la société MWG (http://www.mwg-biotech.com/html/all/index.php). Un clone BAC (44H23) de la variété IR64 a été séquencé par la société GATC biotech (http://www.gatc-biotech.com/fr/index.php). Les neuf autres clones BAC sont en cours de séquençage par le Centre National de Séquençage GENOSCOPE (http://www.cns.fr/externe/English/corps_anglais.html).

L'assemblage des trois clones BAC d'IR64 a été effectué avec le logiciel Lasergene V7 (Burland, 2000) (Annexe 7). L'annotation a été effectuée manuellement sur la base de l'annotation automatique proposée par le logiciel d'annotation automatique de RiceGAAS

(http://RiceGAAS.dna.affrc.go.jp/) ainsi que sur la base des homologies de séquence avec les gènes présents dans la variété Nipponbare.

Les gènes homologues ont été mis en évidence par BBMH (Best Blast Mutual Hit). Un gène candidat d'une variété A est « blasté » sur les séquences disponibles chez une autre variété B. Le gène correspondant à la meilleure cible dans la variété B est alors « blasté » sur les séquences disponibles de la variété A. Il est considéré comme homologue si la meilleure cible correspond au gène candidat de la variété A.

L'homologie de séquences entre les différents gènes candidats est évaluée par alignement deux à deux à l'aide du logiciel Blast 2 sequences (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi). Un alignement des différents gènes candidats est effectué sous CLUSTALW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html) et un arbre est construit avec CLUSTALW sur la base de cet alignement.

e Séquençage des gènes candidats

L'ADN des différentes lignées étudiées a été extrait selon le protocole standard décrit par Berruyer et al. (2003). Vingt marqueurs SSR ont été utilisés pour cartographier finement *Pi33* (Annexe 9). Le protocole d'amplification est décrit au chapitre 1.

Les différents membres du cluster ont été séquencés dans plusieurs variétés. Des amorces ont été dessinées dans chacun des gènes à partir de la séquence disponible pour Nipponbare ou IR64 (Annexe 9). Les produits de ces amplifications par PCR ont été séquencés par les sociétés GENOME Express (France) et MACROGEN (Corée du Sud). Les données de séquençage ont été vérifiées, assemblées et alignées avec le logiciel Staden Package (Staden *et al.*, 1998). La traduction des séquences nucléotidiques en acides aminés a été effectuée sur le site Expasy (http://expasy.org). Les séquences complètes des gènes ont été alignées avec CLUSTAW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html) et un arbre a été construit automatiquement par CLUSTALW sur la base de cet alignement. Pour calculer le rapport Ka/Ks, nous avons utilisé les données de polymorphisme synonyme et non synonyme disponibles pour chacun des gènes sous la base de données Gramene (http://www.gramene.org/) sur la base de la comparaison entre les séquences de Nipponbare et 93-11.

f Données d'expression des gènes

L'expression des différents gènes candidats du cluster de *Pi33* a été évaluée par RT-PCR Quantitative. Les variétés ont été inoculées à trois semaines avec une souche avirulente et une souche virulente. La 3ème feuille a ensuite été prélevée 16h, 24h et 48h après l'inoculation. L'ARN de ces feuilles a été extrait et rétro-transcrit. Le prélèvement, l'extraction d'ARN, le protocole de

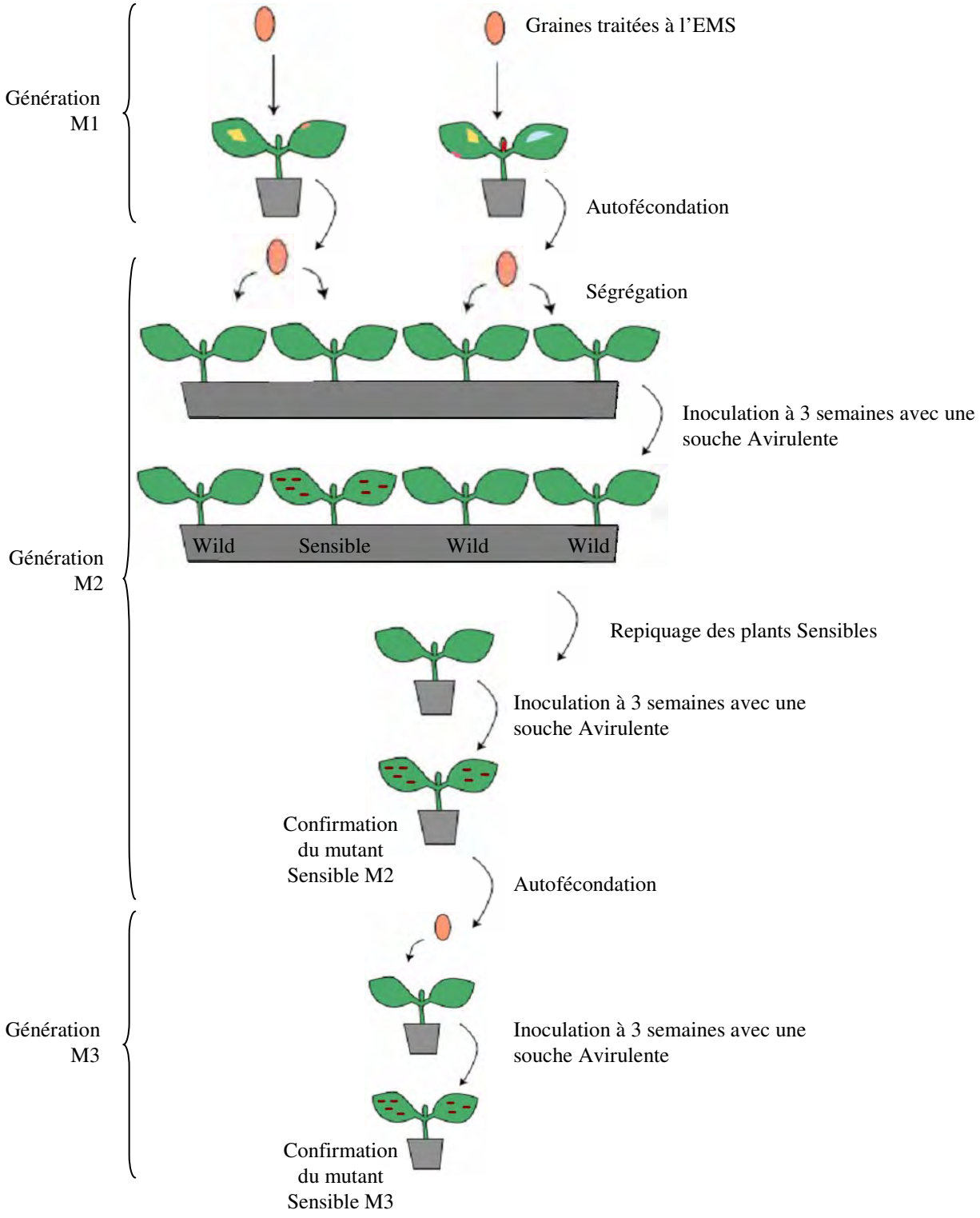


Figure 3.25. Schéma de la sélection phénotypique des mutants C101LAC.

rétro-transcription et le protocole de QPCR sont décrits dans Vergne *et al.* (2007). Des amorces ont été dessinées dans les différents gènes du cluster à partir de la séquence de Nipponbare (Annexe 9). Ces amorces ont été dessinées préférentiellement en 3' à l'aide du logiciel Beacon Designer. La QPCR est mise au point pour chaque couple d'amorces, à l'aide d'une gamme étalon de différentes dilutions d'ADNc. Seules les conditions permettant d'avoir une efficacité d'amplification entre 80 et 120 % ont été conservées. L'actine a été utilisée comme standard interne car son expression ne varie pas au cours de l'infection. Les données d'expression des gènes, dans différentes conditions, sont donc normalisées par rapport à l'expression de l'actine dans les mêmes conditions. Un rapport est ensuite calculé pour chaque gène et à chaque temps entre la quantité d'ARN en condition d'infection et la quantité d'ARN en condition non inoculée.

III.5.2 Criblage de banques de mutants

a Matériel végétal et culture du riz

Une population de 2 079 mutants issus de la variété indica résistante IR64 a été criblée par TILLING à l'IRRI selon le protocole décrit par Raghavan *et al.* (2007). Différents lots de graines de la variété IR64 ont été traités avec l'agent mutagène diepoxybutane (0.006%) (Wu et al., 2005).

Afin de créer des mutants de *Pi33*, une population de 4 608 lignées mutantes a été créée à partir de la variété indica résistante C101LAC par traitement à l'EMS (Ethyl Methane Sulfonate). Cette population de mutants a été créée au sein du laboratoire, en collaboration avec Bayer Crop Science, dans le cadre du projet Génoplante RiceTill. C101LAC est une lignée isogénique de la variété CO39 obtenue à l'IRRI (International Rice Research Institute). C101LAC porte les gènes de résistance *Pi1* et *Pi33* (Berruyer *et al.*, 2003). Une autre lignée isogénique de CO39, C104 LAC, ne contient que le gène de résistance *Pi1*. Les graines de la variété C101LAC ont été traitées avec une solution d'EMS à 90mM. Les plantes M1 issues de ces graines ont été autofécondées pour obtenir des graines M2. Les descendants M2 de ces mutants ont été criblés par une inoculation avec la souche BG1 (Avr*Pi33*) (Figure 3.25). Ils ont ensuite été multipliés par autofécondation afin d'obtenir une population M3.

Les lignées de riz sont cultivées dans un mélange de terreau et de pouzzolane (Annexe 2). Les semis sont réalisés à raison de 20 graines par ligne afin de détecter au moins une plante mutante dans chaque lignée mutée pour la résistance contrôlée par *Pi33*. En effet, en suivant les règles mendéliennes et en considérant que la mutation est récessive, en théorie, une ségrégation de trois quarts de phénotype sauvage et un quart de phénotype mutant est attendue en génération M2. Mais, lors du développement de la graine, seulement quatre cellules participent à la formation

des graines de la génération suivante. Donc, si une seule de ces cellules porte la mutation observée, la proportion de plantes mutantes devient :

$$(1/4)/4 = 0.0625 \text{ soit } 1.25 \text{ plantes mutantes / 20 graines}$$

Donc, en semant 20 graines pour chaque lignée, la probabilité de détecter une mutation dans une lignée est d'environ 40 % (probabilité estimée à partir d'une loi binomiale).

b Criblage des banques de mutants

Deux méthodes de criblage ont été utilisées. Sur la banque de mutants IR64 de l'IRRI, un criblage par Tilling a été effectué par Geethanjali Subramaniam dans l'équipe de Hei Leung. Trois amorces ont été dessinées et ciblent 500 bp dans trois copies différentes de NB11 : 64-NB11-4,5, 64-NB11-3,5 et l'homologue de Nip-NB11 (Annexe 9). Les banques de mutants C101LAC ont été criblées phénotypiquement sur la base de leur sensibilité à la souche de *M. oryzae* BG1, avirulente vis-à-vis de *Pi33* (Figure 3.21). Les plantes mutantes M2, plus sensibles que le témoin résistant C101LAC lors de cette première inoculation, ont été maintenues en culture. La sensibilité est évaluée par rapport à deux témoins : C101LAC, résistant aux souches BG1 et CD69, et C104 LAC, sensible à BG1 mais résistant à CD69. Une deuxième inoculation avec la souche BG1 a été effectuée pour confirmer les phénotypes retenus lors de la première inoculation. Puis, une troisième inoculation a été effectuée avec la souche CD69 qui est avirulente pour un autre gène de résistance (*Pi1*) impliqué dans l'interaction riz / *M. oryzae*. Cette inoculation nous permet de déterminer si la mutation est spécifique du gène de résistance *Pi33*. Les mutants confirmés ont ensuite été multipliés par autofécondation afin d'obtenir une population de lignées M3. Cette population a été semée et inoculée avec la souche BG1 pour confirmer le phénotype sensible.

c Caractérisation des mutants, données moléculaires

L'ADN des différentes lignées étudiées a été extrait selon le protocole standard décrit par Berruyer *et al.* (2003). Le séquençage des mutants M2 sensibles a été fait à partir d'une première PCR « long-range » du gène candidat NB11-3,5. Le protocole d'amplification est décrit en Annexe 10. Huit couples d'amorces ont été utilisés sur une dilution au cinquantième du produit de PCR « long-range » pour amplifier des fragments du gène (Annexe 10). Les produits de ces deuxièmes PCR ont été séquencés par la société GATC Biotech. Les données de séquençage ont été vérifiées, assemblées et alignées avec le logiciel Staden Package (Staden *et al.*, 1998). La traduction des séquences nucléotidiques en acides aminés a été effectuée sur le site Expasy (http://expasy.org).

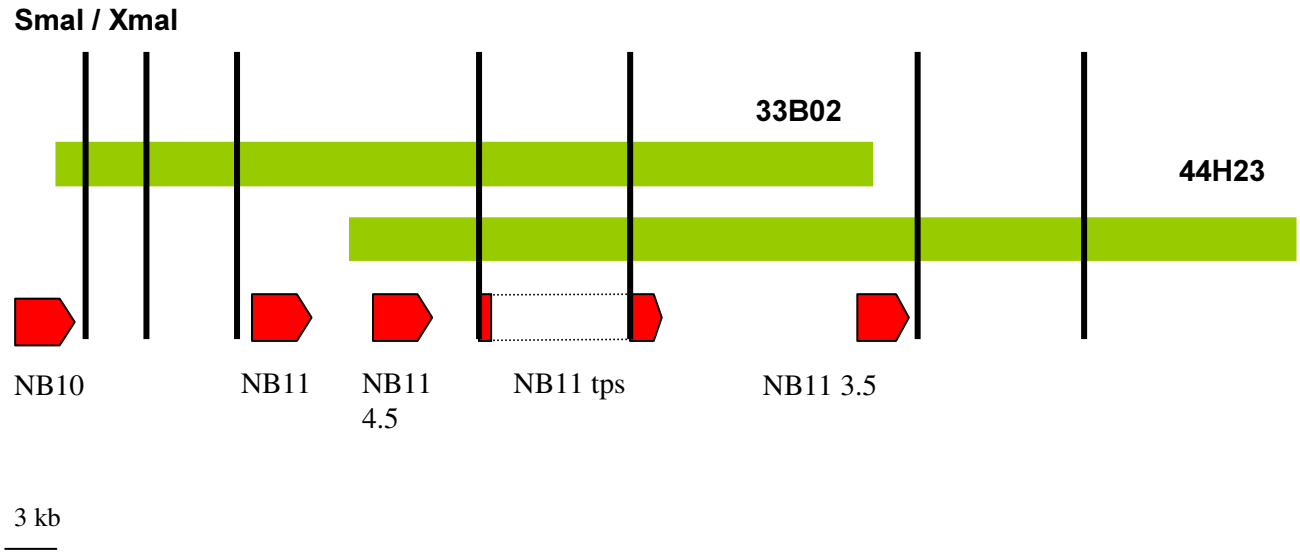


Figure 3.26. Plan de sous-clonage des clones BAC 33B02 et 44H23.

Les clones BAC sont représentés en vert. Les gènes candidats de types NBS-LRR sont représentés en rouge. Les traits verticaux représentent les sites des enzymes SmaI/XmaI.

III.5.3 Tests de complémentation

Les clones BAC sont mis en culture avec l'antibiotique chloramphénicol (Protocole détaillé en annexe 13). L'extraction d'ADN a été réalisée avec le kit d'extraction Nucleobond® AX de Macherey-Nagel (Annexe 13). Les ADN extraits ont été digérés par l'enzyme de restriction NotI dans le cas du clonage de BAC entiers et SmaI ou XmaI dans le cas du sous-clonage selon le protocole en Annexe 14. Le choix de ces enzymes a été déterminé à partir des séquences partielles des clones BAC. L'enzyme NotI permet de couper le clone BAC 33B02 en un gros fragment de 57 kb et deux petits fragments de quelques kb. Le clone BAC 03M23 est découpé en trois fragments de 60kb, 10kb et 4,5 kb. Les enzymes SmaI et XmaI, qui reconnaissent les mêmes sites, permettent de digérer les clones BAC sans couper dans les gènes candidats (Figure 3.26). Nous nous attendons à 6 fragments de 2,5 à 16 Kb pour le clone 33B02 et à 5 fragments de 2,5 à 20 Kb pour le clone 44H23.

Les vecteurs de destination, pTAC37 et pCAMBIA 5300 (Annexe 15), sont mis en culture avec de la kanamycine. L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit Wizard® Plus SV Miniprep de Promega (Annexe 13). A la fin de la digestion, l'ajout d'une phosphatase, APex™ Heat-labile Alkaline Phosphatase d'Epicentre, permet de déphosphoryler le vecteur et éviter ainsi sa ligation sur lui-même. Lors de la ligation, les inserts et le vecteur sont mélangés dans des proportions variables (3 :1, 1 :1 ou 1 :3).

Le produit de ligation est ensuite inséré dans des cellules chimiocompétentes d'*E. coli* MAX Efficiency® DH10B™ d'Invitrogen par choc thermique (Annexe 12). Du X-gal (20 mg/mL) et de l'IPTG (200 mg/mL) sont ajoutés lors de l'étalement pour faciliter le criblage des colonies. En effet, le plasmide pCAMBIA 5300 possède le gène Lac Z de l'opéron lactose d'*E. coli* qui peut être utilisé comme marqueur de sélection. Seules les colonies blanches qui sont résistantes à la kanamycine et transformées par les plasmides recombinants seront repiquées dans du milieu LB liquide pour multiplier ces souches et extraire l'ADN plasmidique avec le kit d'extraction de plasmides Qiagen® (Annexe 13).

La présence d'un insert dans le plasmide recombinant est ensuite confirmé par digestion avec l'enzyme appropriée (Annexe 14). Dans certains cas, une PCR avec des couples d'amorces (Annexe 14) amplifiant différentes zones des clones BAC étudiés a été effectuée pour vérifier quelle zone des clones BAC a été clonée. Les extrémités de l'insert ont été séquencées par la société GATC Biotech avec les amorces universelles M13. Ces séquences ont été comparées aux séquences des clones BAC 33B02 et 44H23 dont nous disposons.

Les transformations de plants de riz ont été faites au CIRAD de Lavalette par D. Meynard et C. Fallet selon le protocole de Sallaud *et al.* (2003).

IV Chapitre 3

Transduction du signal Pi33

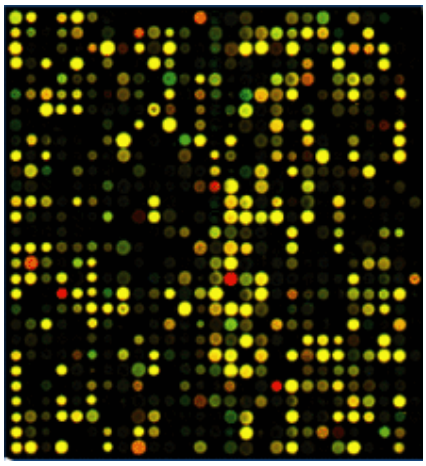


Photo : source Wikipedia

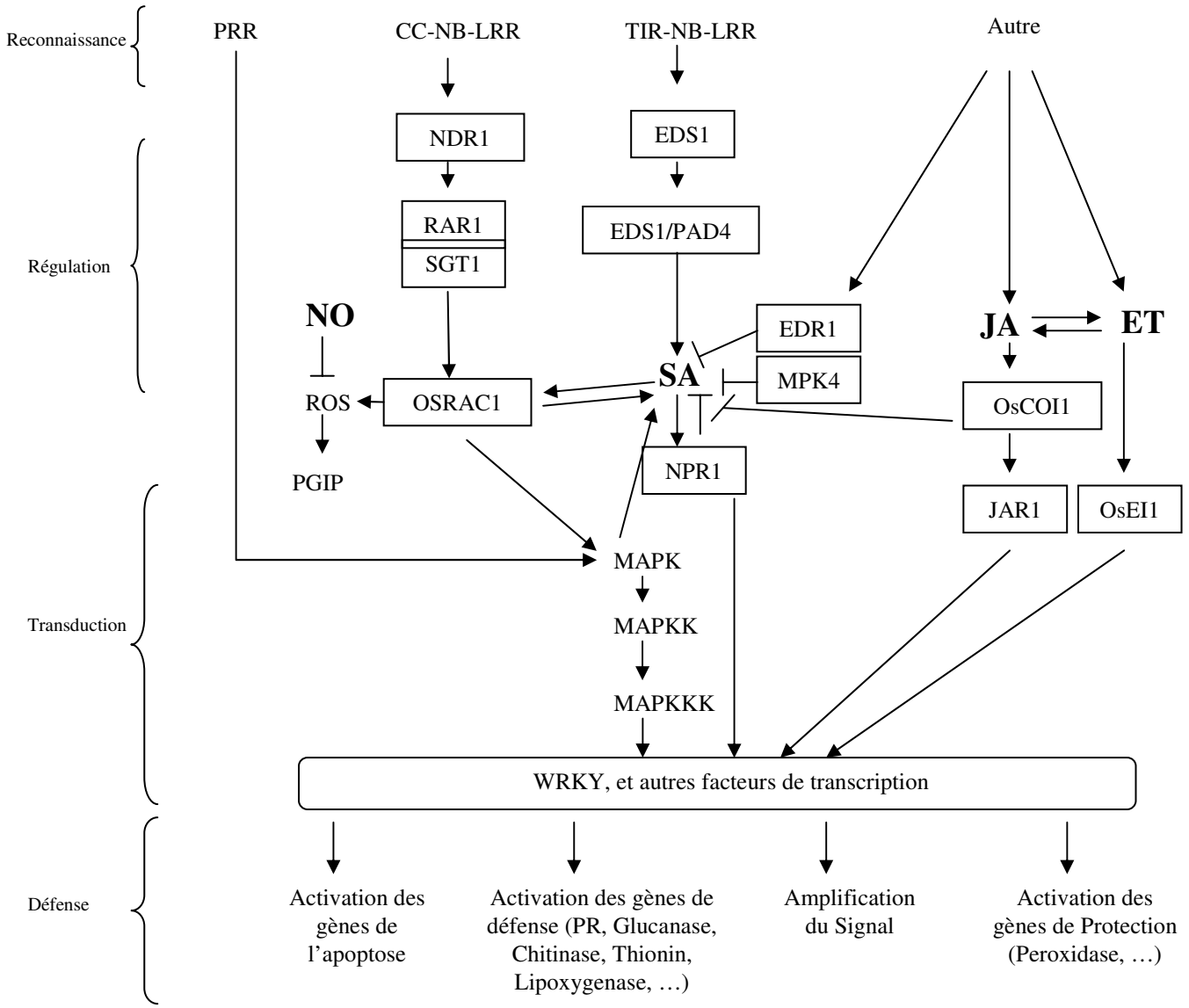


Figure 4.1. Schéma des réactions de défense.

Adapté de Hofius *et al.,* 2007 et Hammond-Kosack et Parker, 2003. Les principaux gènes indiqués ont été trouvés chez Arabidopsis et/ou chez le Riz.

IV.1 Introduction

Nous avons déjà décrit en introduction comment les gènes de résistance s'inscrivent dans la réponse des plantes à l'attaque par des agents pathogènes. Le système de défense des plantes est très étudié notamment chez Arabidopsis (Glazebrook, 2005). Plusieurs gènes clefs du système de régulation ont ainsi été mis en évidence. Cependant, peu d'information sur le système de défense est disponible chez les monocotylédones et, en particulier, chez le riz. Il parait donc dans un premier temps nécessaire de revenir sur les connaissances acquises sur le système de défense d'Arabidopsis puis de rassembler les connaissances disponibles chez le riz.

IV.1.1 Les réactions de défense chez les plantes

La plante peut mettre en œuvre plusieurs niveaux de défense : une défense générique dite basale et une défense spécifique (voir Introduction paragraphe I.1.2.c). Ces deux niveaux de défense peuvent être induits par l'agent pathogène ou parfois préformés. Le système de défense peut se résumer schématiquement en quatre étapes : reconnaissance, régulation, transduction du signal, et enfin réactions de défense à proprement parlé (Figure 4.1).

a <u>La reconnaissance</u>

Cette étape fait intervenir bien sûr les **gènes de résistance** spécifiques que nous avons déjà décrits dans les chapitres précédents. Mais, elle fait également intervenir les « **Pattern Recognition Receptors »** (PRR). Les deux exemples les mieux décrits de ce système de défense générique sont les gènes *FLS2* et *EFR*. *FLS2* et *EFR* codent pour des LRR-kinases qui reconnaissent respectivement la flagelline des bactéries phytopathogènes (Zipfel *et al.*, 2004) et un facteur d'élongation bactérien (Zipfel *et al.*, 2006). Les PRR visent des « Pathogen-Associated Molecular Pattern » (PAMP) que l'agent pathogène peut difficilement modifier. Dans les cas de FLS2 et EFR, les PAMP associés ont été identifiés (*flg22* et *EF-Tu*). Pour contrer les PRR, les agents pathogènes ont développé des effecteurs qui peuvent déjouer ce premier niveau de défense mais qui sont la cible des gènes de résistance spécifiques (Dangl et Jones, 2006).

b <u>La régulation</u>

Suite à ce premier niveau de reconnaissance, un système de régulateurs se met en place. Leurs actions sont déclenchées par le système de reconnaissance. Au moins trois voies de régulation ont été décrites à partir de l'identification de mutants chez Arabidopsis.

La voie EDS1/PAD4 (Enhanced Disease Susceptibility/PhytoAlexin Deficient ; Parker *et al.*, 1996) aurait tendance à être plutôt employée par les gènes de résistance de type TIR-NBS-

LRR. La voie NDR1 (Non-race-specific Disease Resistance) (Century *et al.*, 1997) aurait tendance à être plutôt employée par les gènes de résistance de type CC-NBS-LRR. Une troisième voie, impliquant les gènes COI1 et JAR1 permet la détection d'agents pathogènes nécrotrophes et est décrite comme indépendante de l'**Acide Salicylique (SA)**.

Les deux premières voies sont décrites comme faisant intervenir le SA dans les mécanismes de régulation. Le SA est une phytohormone qui serait nécessaire à la Réponse Systémique Acquise (SAR) (Durner *et al.*, 1997). Il s'accumule dans la cellule au cours des réactions compatibles et incompatibles. De plus, l'apport exogène de SA induit la SAR et restaure la résistance chez certains mutants (Klessig et Malamy, 1994). Le SA interagirait ensuite avec différentes protéines dont la protéine SABP (SA Binding Protein) qui régule le « burst oxydatif » en dégradant le H_2O_2. Le SA induirait également l'activation de protéines MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase ; Meskiene et Hirt, 2000).

Les voies indépendantes du SA font intervenir deux autres phytohormones : l'**Acide Jasmonique** (**JA**) et **l'Ethylène** (**ET**) qui déclenchent une résistance induite systémique (ISR). Ils induisent l'accumulation de métabolites secondaires et de protéines de défense (Gundlach *et al.*, 1992 ; Van Der Fits et Memelink 2000 ; Devoto et Turner, 2003). Bien que le JA et l'ET soient décrits, la plupart du temps, comme agissant en synergie (Xu *et al.*, 1994), ces deux molécules peuvent également contrôler l'expression de différents gènes cibles, voire agir de façon opposée (Overmyer *et al.*, 2000).

Ces deux voies de régulation hormonales (SA d'un côté et JA/ET de l'autre) seraient déclenchées en fonction du type d'agent pathogène qui attaque la plante. En général, les agents pathogènes biotrophes induisent la voie du SA alors que les agents pathogènes nécrotrophes ou les herbivores induisent la voie du JA/ET (Ton *et al.*, 2002). Cependant, ces deux voies ne sont pas complètement cloisonnées et des interactions existent (Jalali *et al.*, 2006). Le SA supprimerait la voie JA par l'intermédiaire du gène *NPR1* (Pieterse et Van Loon, 2004). Dans certains cas, au contraire, les deux voies agiraient de concert (Van Wees *et al.*, 2000) et le JA pourrait être un élément mobile qui permet la SAR (Grant et Lamb, 2006).

c La transduction du signal

Les **MAPK** sont décrites comme intervenant très tôt dans la cascade des réactions de défense (Zhang et Klessig, 2001). Plusieurs travaux ont permis de disséquer toute la cascade de phosphorylations mettant en jeu des MAPK, notamment dans le cadre d'une reconnaissance faisant intervenir FLS2 (Asai *et al.*, 2002). Les composants de cette voie de signalisation, correspondant aux MAPKKK, MAPKK et MAPK, ont été identifiés chez Arabidopsis et sont en

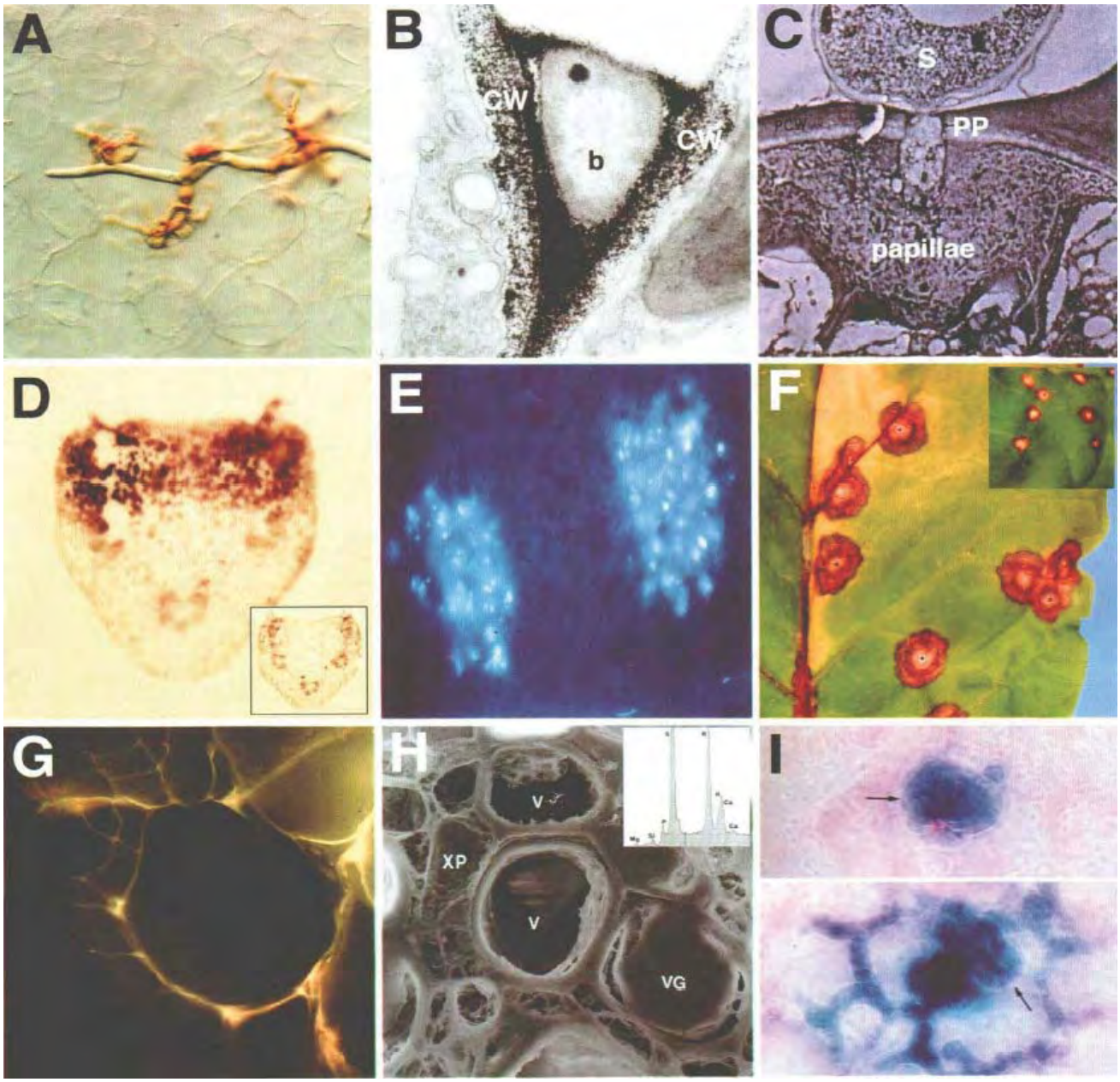


Figure 4.2. Les différents types de réponses induites par le système de défense des plantes.
d'après Hammond-Kosack et Jones (1996).
(A) Réponse Hypersensible dans les cellules du mésophylle dans l'interaction Laitue/*Bremia lactucae.*
(B) Production de H_2O_2 dans l'interaction Laitue/*Pseudomonas syringae.*
(C) Formation des Papilles au niveau du point de pénétration (PP) sous la spore (S). Interaction Orge/*Erysiphe graminis.*
(D) Accumulation de glycoprotéine riche en hydroxyproline (HRGP) dans l'interaction *Brassica campestris / Xanthomonas campestris.*
(E) Depôt de callose dans l'interaction Arabidopsis/*Peronospora parasitica*.
(F) Formation de lésion dans l'interaction Tabac/TMV.
(G) Lignification et reprise des divisions cellulaires dans l'interaction *Brassica napus/Leptosphaeria maculans*.
(H) Formation de tylose dans les vaisseaux du xylème (V) dans l'interaction Cacaoyer/*Verticillum dahlíae*.
(I) lnduction d'un promoteur p-13-glucanase dans l'interaction Tomate/*Cladosporium fulvum* observé par fusion GUS.

cours d'identification chez d'autres plantes. Cette cascade entraînerait l'activation de facteurs de transcription, notamment de type WRKY.

Les facteurs de transcription interviennent en fin de cascade. Plusieurs types de facteurs de transcription ont été décrits : les protéines WRKY (Eulgem *et al.*, 2000), les ERF (Ethylene Responsive Factor) (Ohme-Takagi *et al.*, 2000), les facteurs MYB (Myeloblastosis viral oncogene ; Kranz *et al.* 1998), les facteurs TGA b-ZIP (TGA basic leucine zipper).

d Les mécanismes de défense

Plusieurs mécanismes de défense sont ensuite déclenchés. Certains sont spécifiques de certaines voies de régulation, d'autres sont plus généraux.

La réponse hypersensible (HR) qui se traduit par une mort cellulaire programmée est une réponse typique de la résistance complète et, donc, de la reconnaissance spécifique par un gène de résistance (Agrios, 1988). Elle se traduit par de petites lésions nécrotiques au niveau du point d'entrée de l'agent pathogène (Figure 4.2). Cette mort cellulaire qui survient rapidement provoque la mort d'un agent pathogène biotrophe en le privant de sa source de nutriments. Les mécanismes de la réponse hypersensible ont fait l'objet d'une synthèse par Greenberg et Yao (2004). Lors de la HR, des modifications des mitochondries et des chloroplastes sont observées, la membrane perd la capacité de plasmolyse et le cytoplasme se vacuolise, la chromatine se condense. Ces processus sont similaires au phénomène d'apoptose chez les animaux mais pourraient varier d'un agent pathogène à l'autre. Ainsi, des différences significatives de synchronisation de la HR ont été observées lors d'interactions avec des agents pathogènes très proches (Ritter et Dangl, 1996). Enfin, il faut souligner que la résistance complète ne s'accompagne pas toujours d'une HR. En effet, dans certains cas de résistance extrême, la réponse induite par le gène de résistance serait tellement efficace qu'elle provoquerait la mort de l'agent pathogène avant le déclenchement de la HR. Ainsi, les gènes de résistance Rx et *mlo* ne produisent pas de phénotype de type HR.

Le « burst oxydatif » ou production de forme réactive de l'oxygène (ROS) est souvent un des premiers mécanismes des réactions incompatibles (Figure 4.2) liés à la HR. Via l'oxydase NADPH, la plante produit des anions superoxyde O_2^- qui sont rapidement dismutés en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui est lui-même transformé en formes plus réactives. Il existe plusieurs voies de production des ROS qui ne sont pas toutes impliquées dans une réaction incompatible. Le H_2O_2 aurait plusieurs rôles, non seulement de toxicité vis-à-vis des agents pathogènes mais également de renforcement indirect des parois cellulaires (Tenhaken *et al.*, 1995). Il serait également un messager secondaire dans la HR en activant des gènes permettant la mise en place

			induction/repression par :								la surexpression entraîne une augmentation de la résistance
type de protéine PR	nombre de gènes identifiés chez le riz	exemples	*Magnaporthe oryzae*	autre agent pathogène	éliciteur fongique (chitosan, chitine…)	SA	JA	ET	ABA	H_2O_2	
PR1a	1	OsPR1a	+	nd	nd	+	+	+	+	+	nd
PR1b	1	OsPR1b	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	nd
PR2	13	OsGns1	nd	nd	+	+	nd	+	nd	nd	riz/*Magnaporthe oryzae*
PR3, 4, 8 et 11	5, famille mutigénique supposée nombreuse	Cht-1-3	nd	nd	+	+	nd	+	nd	nd	nd
		Rcht2	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		RC24	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		OsPR3	nd	*Rhizoctonia solani*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		OsPR4	+	nd	nd	ABS	+	ABS	nd	ABS	nd
PR5	3	OsPR5	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	riz/*Rhizoctonia solani*
		pPIR2	nd	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		?	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	blé/*Fusarium graminearum*
PR6	5	OsBBPI	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd
		RBBI2-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	riz/*Magnaporthe oryzae*
		OsPIN	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PR7	1	RSP1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PR9	42	POX22.3	nd	nd	nd	+	+	+	-	nd	nd
PR10	6	PBZ1	+	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd
		RPR10b	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		JIOsPR10	nd	nd	nd	+	+	nd	ABS	+	nd
PR12	90	ABS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PR13	1	OsThi1	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd
PR14	9	OsPR14	nd	*Pseudomonas syringae*	nd	+	nd	nd	+	nd	nd
		LTP1	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		LTP110	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PR15	2	OsPR15	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tableau 4.1. Les protéines PR chez le riz.

Informations fournies par E. Vergne adaptées de Jwa *et al.* (2006) .

La dernière colonne donne le pathosystème au sein duquel la surexpression du gène PR considéré améliore la résistance.

+ = induction, - = répression, ABS = absence d'effet, nd = non testé.

de l'apoptose (Heath, 2000). Enfin, il participerait à la synthèse des lipoxygenases qui sont impliquées dans les premières étapes de la synthèse du JA.

La formation d'oxyde nitrique (ou NO) pourrait interagir avec les radicaux O_2^- pour former une espèce d'oxygène fortement oxydante ONOO- (peroxynitrite) favorisant l'apoptose (Wendehenne *et al.* 2001). La participation du NO dans le système de défense a également été démontrée (Delledone *et al.*, 1998). L'oxyde nitrique participe également à la production de métabolites secondaires et des protéines PR (Hu *et al.*, 2003).

Le renforcement des parois cellulaires est un rempart efficace à la pénétration des agents pathogènes. L'agent pathogène produit de nombreuses enzymes pour détruire la paroi végétale (pectinases, cellulases, xylanases et polygalacturonases). La plante est capable de produire des inhibiteurs de ces enzymes notamment les Polygalacturonase Inhibiting Proteins (PGIP). Le renforcement des parois cellulaires peut se faire grâce à la formation de papilles (Figure 4.2) et de dépôts de callose (Figure 4.2) au niveau du point de pénétration de l'agent pathogène. La plante renforce également les parois par accumulation de protéines pariétales (glycoprotéines riches en hydroxyproline HRGP, protéines riches en glycine ou en proline).

La production de protéines de défense (Pathogenesis Related PR) est décrite dans les réactions compatibles et incompatibles. On compte jusqu'à 17 familles de protéines PR dont certaines ont des propriétés antifongiques ou antibactériennes : chitinases, glucanases, « cystein-rich », thionines, ... (Van Loon *et al.*, 2006). La production de phytoalexines est également largement décrite (Tsuji *et al.*, 1992).

IV.1.2 Les réactions de défense chez le riz

Les réactions de défense ont surtout été étudiées chez Arabidopsis. D'une manière générale, les gènes de défense identifiés chez le riz l'ont été de trois manières différentes : par analogie avec Arabidopsis, par crible de collections de mutants, par analyse de données de puces à ADN.

Par analogie avec ce qui a été trouvé chez Arabidopsis, quelques composants impliqués dans les réactions de défense chez le riz ont été identifiés. C'est le cas par exemple de gènes impliqués dans la transduction du signal de type MAPK (*BWMK1* : Cheong *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 1999 ; *OsMAPK5* : Xiong et Yang, 2003) ou de facteurs de transcription (*Jamyb* : Lee *et al.*, 2001 ; *OsWRKY13* : Qiu *et al.*, 2007). Des éliciteurs, comme la protéine *EL5* (Takai *et al.*, 2002) et des régulateurs similaires à *Rac1* et *NPR1*, ont également été identifiés. La protéine *OsRac1*, de type GTP binding, est un régulateur clef de la HR par son rôle dans l'activation du « burst oxydatif » (Kawasaki *et al.*, 1999 ; Ono *et al.*, 2001). La protéine NRR (Negative Regulator of Resistance) interagirait avec NH1, un orthologue de NPR1 chez le riz (Chern *et al.*, 2005). La transformation

du gène NPR1 d'Arabidopsis chez le riz permet d'augmenter la résistance à *X. oryzae* ce qui semble indiquer que cette voie serait conservée entre le riz et Arabidopsis (Chern *et al.*, 2005). Plusieurs protéines PR ont également été identifiées et sont répertoriées par Jwa *et al.* (2006) (Tableau 4.1). Des comparaisons d'expression de la protéine PR1 chez le tabac et des protéines *OsPR1a* et *OsPR1b* chez le riz semblent indiquer que les systèmes de régulation de ces protéines ne sont pas similaires entre les deux plantes (Agrawal *et al.*, 2001). Enfin, le gène *OsLSD1* homologue de *Lsd1* a été démontré comme étant un régulateur négatif de la mort cellulaire (Wang *et al.*, 2005).

Le crible de collections de mutants a permis d'identifier des mutants de type eds (enhanced disease susceptibility) et de type LM (Lesion Mimic). Les mutants eds présentent un phénotype plus sensible suite à l'infection par un agent pathogène (Campbell et Ronald, 2005). Les mutants LM (Walbot, 1983) forment des lésions nécrotiques même en l'absence d'agent pathogène. Ces mutants pourraient être défectueux dans la cascade de signaux sensés réguler la HR (Dangl *et al.*, 1996). Trois collections de mutants de riz ont été caractérisés et ont permis l'identification de mutants LM : 13 mutants spl (spotted leaf) et trois mutants cdr (cell death and resistance). Certains de ces mutants présentent également une résistance accrue à *M. oryzae* (Yin *et al.*, 2000; Mizobouchi *et al.*, 2002). Bien que les gènes à l'origine de ces phénotypes et leur place dans la cascade de régulation aboutissant à la mort cellulaire ne soient pas toujours identifiés, plusieurs mutants ont pu être caractérisés. Le gène *Spl7* a été cloné et code pour un facteur de transcription lié au stress (Yamanouchi *et al.*, 2002). Le gène *Spl11* est un régulateur négatif de la mort cellulaire et code pour une protéine U-box (Zeng *et al.*, 2004). Le gène *Spl18* (ou *OsAt1*) a également été caractérisé et code pour une Acyltransférase (Mori *et al.*, 2007). D'autre part, certains de ces mutants ont été utilisés dans des analyses de protéomique afin d'identifier les gènes dont l'expression est modifiée dans les phénotypes mutants (*Cdr2*, Tsunezuka *et al.*, 2005 ; *blm*, Jung *et al.*, 2006).

Enfin, une dernière méthode pour identifier de nouveaux gènes de défense dans le riz consiste à analyser l'expression différentielle des gènes entre différentes interactions plante-agent pathogène. Des données issues de puces à ADN ou la comparaison de banques d'ADNc permettent d'explorer les variations d'expression d'un grand nombre de gènes. Ce type d'analyse permet d'identifier les gènes induits ou réprimés lors de différents types d'interactions compatibles ou incompatibles. Ainsi des gènes ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés lors d'interactions avec *M. oryzae* (Kim *et al.*, 2001; Rauyaree *et al.*, 2001; Jantasuriyarat *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2006), avec *X. oryzae pv. oryzae* (Chu *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2006) ou avec le virus Rice Yellow Mottle (Ventelon-Debout *et al.*, 2003). Des banques d'ADNc ont également été

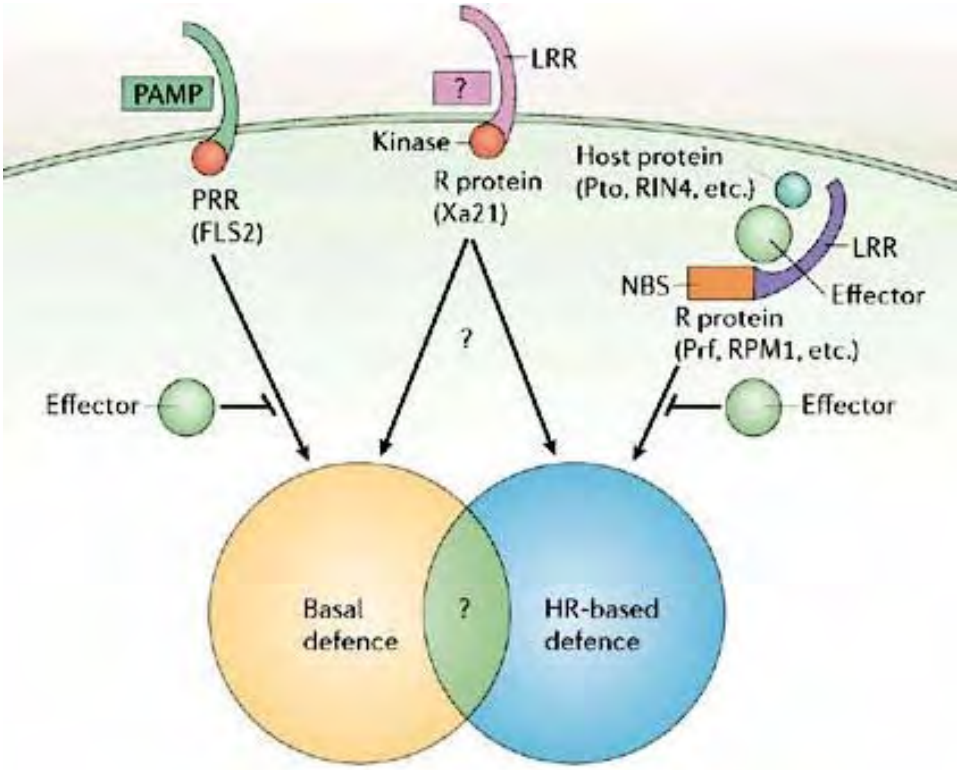


Figure 4.3. Points communs entre le système de défense basal et la HR.

D'après Abramovitch *et al.* (2006).

construites (Kim *et al.*, 2000 ; Xiong *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2004; Shim *et al.*, 2004). Ensuite, une fois ces gènes identifiés, ils sont confirmés par génétique inverse. L'expression de ces gènes peut être supprimée par ARN interférence ou induite par surexpression. Ainsi, dans plusieurs cas, la surexpression des gènes PR du riz met en évidence un phénotype de résistance (Tableau 4.1).

Bien que plusieurs gènes de défense ou régulateurs aient ainsi été identifiés chez le riz, pour l'instant les relations entre ces gènes ne sont pas connues et il est difficile de proposer un schéma des réactions de défense comme pour Arabidopsis.

IV.1.3 Quelles similitudes entre les réactions de défense induites par différents types d'interactions ?

Plusieurs études ont cherché à comparer l'expression des gènes induits lors de différents types d'interactions (Figure 4.3). Ces études utilisent l'analyse par puce à ADN qui permet d'explorer les variations d'expression d'un grand nombre de gènes. En moyenne, l'expression de 10 à 20% des gènes est modifiée lors d'une infection (Schenk *et al.*, 2000 ; Tao *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2006). La plupart de ces gènes peuvent être classés facilement selon leur fonction et, bien sûr, beaucoup d'entre eux sont connus pour être impliqués dans les réactions de défense. Cependant, d'autre fonctions sont mises en évidence de manière récurrente : la maintenance cellulaire et le développement (Schenk *et al.*, 2000) et la photosynthèse (Zhou *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2004 ; Shim *et al.*, 2004). Les différences d'expression des gènes induits lors des interactions incompatibles et compatibles semblent être essentiellement quantitatives et décalées dans le temps (Tao *et al.*, 2003 ; Lu *et al.*, 2004). Les comparaisons entre plusieurs situations incompatibles semblent également indiquer l'induction de gènes communs (Schenk *et al.*, 2000). Une comparaison entre l'ensemble des gènes induits par l'interaction Arabidopsis/*P. syringae* de manière dépendante du SA et l'ensemble des gènes induits par l'interaction Arabidopsis/*A. brassicicola* de manière dépendante du JA a révélé que plus de 50% de ces gènes étaient communs (Van Wees *et al.*, 2003). De même, malgré un système de régulation très différent, les gènes induits lors d'interactions impliquant les gènes de résistance *RPP4*, *RRP7* et *RPP8* sont globalement les mêmes (Eulgem *et al.*, 2004). Cependant, une comparaison chez le riz entre les gènes induit par le champignon *M. grisea* et la bactérie *X. oryzae* semblerait indiquer qu'il existerait deux voies différentes de régulation (Lu *et al.*, 2004) avec des points communs (Li *et al.*, 2006).

Chaque nouvelle étude sur le sujet révèle l'implication de nouveaux gènes, ce qui laisse à penser que beaucoup d'éléments restent à découvrir. De plus, bien que le système de défense chez Arabidopsis soit bien décrit, encore relativement peu de régulateurs ont été identifiés chez le riz.

IV.1.4 Objectifs

Notre objectif est donc de compléter les connaissances sur le système de défense du riz en identifiant un ensemble de gènes différentiellement exprimés dans l'interaction incompatible *ACE1/Pi33*. La comparaison de l'expression d'un grand nombre de gènes (puces à ADN) dans différentes conditions d'infection, nous a permis d'identifier cet ensemble de gènes (article 3 ci-après : Vergne *et al.*, 2007). Nous avons pu montrer que certains de ces gènes sont différentiellement exprimés dans l'interaction *ACE1/Pi33* par rapport à l'interaction compatible (Vergne *et al.*, 2007). En comparant l'interaction incompatible *ACE1/Pi33* avec une autre interaction incompatible, nous avons également pu montrer que l'expression de certains gènes est potentiellement spécifique de l'interaction incompatible *ACE1/Pi33* (Vergne *et al.*, 2007). Mais, ces différences ont été observées entre des fonds génétiques très différents (indica et japonica). Les différences d'expression observées pourraient donc être le résultat de la structuration génétique du riz plus que de la spécificité des mécanismes de défense. Nous avons donc voulu confirmer ce résultat dans d'autres interactions incompatibles faisant intervenir différents gènes de résistance à *M. oryzae* dans des fonds génétiques comparables.

IV.2 Article 3 : Early and specific gene expression triggered by rice resistance gene Pi33 in response to infection by ACE1 avirulent blast fungus

Early and specific gene expression triggered by rice resistance gene *Pi33* in response to infection by *ACE1* avirulent blast fungus

E. Vergne[1]*, E. Ballini[1]*, S. Marques[1], B. Sidi Mammar[1], G. Droc[2], S. Gaillard[2], S. Bourot[4], R. DeRose[4], D. Tharreau[1], J.-L. Nottéghem[1], M.-H. Lebrun[3] and J.-B. Morel[1]

[1]UMR BGPI INRA/CIRAD/AgroM, Campus International de Baillarguet, T41/K 34398 Montpellier, France; [2]UMR PIA CIRAD TA40/03 Avenue Agropolis 34398 Montpellier Cedex 5, France; [3]UMR 2579 CNRS, BayerCropscience, 14–20 Rue Pierre Baizet BP 9163, 69263 Lyon Cedex 09, France; [4]Bayer BioScience NV, Technologiepark 38, B-9052 Zwijnaarde, Belgium

Author for correspondence:
J.-B. Morel
Tel: +33 499624 837
Fax: +33 499624 822
Email: jbmorel@cirad.fr

Received: *31 August 2006*
Accepted: *9 November 2006*

Summary

- Our view of genes involved in rice disease resistance is far from complete. Here we used a gene-for-gene relationship corresponding to the interaction between atypical avirulence gene *ACE1* from *Magnaporthe grisea* and rice resistance gene *Pi33* to better characterize early rice defence responses induced during such interaction.
- Rice genes differentially expressed during early stages of *Pi33/ACE1* interaction were identified using DNA chip-based differential hybridization and QRT-PCR survey of the expression of known and putative regulators of disease resistance.
- One hundred genes were identified as induced or repressed during rice defence response, 80% of which are novel, including resistance gene analogues. *Pi33/ACE1* interaction also triggered the up-regulation of classical PR defence genes and a massive down-regulation of chlorophyll a/b binding genes. Most of these differentially expressed genes were induced or repressed earlier in *Pi33/ACE1* interaction than in the gene–for–gene interaction involving Nipponbare resistant cultivar.
- Besides demonstrating that an *ACE1/Pi33* interaction induced classical and specific expression patterns, this work provides a list of new genes likely to be involved in rice disease resistance.

Key words: *ACE1/Pi33* gene-for-gene interaction, defence response, *Magnaporthe grisea*, *Oryza sativa* (rice).

New Phytologist (2007) **174**: 159–171

No claim to original French government works.
Journal compilation © *New Phytologist* (2007)
doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01971.x

Introduction

The hypersensitive response (HR) in plants is often controlled by gene-for-gene systems where an avirulence gene in the pathogen matches the allelic form of a particular resistance gene in the plant. Downstream of this recognition event, signalling transduction pathways controlled by regulator genes are activated and lead to differential expression of defence-related genes (Dangl & Jones, 2001; Van Loon *et al.*, 2006). Thus three types of genes are involved in the HR response: resistance genes, regulator genes and defence genes. Pathogenesis-related (PR) proteins fall into the latter class of defence genes (Van Loon *et al.*, 2006). Our current picture of which genes are involved in disease resistance in monocotyledons is rather poor. By contrast, extensive studies in the plant model Arabidopsis have demonstrated that between 11% (Schenk *et al.*, 2000) and 22% (Tao *et al.*, 2003) of the genes are differentially regulated in a single situation (for review, see Eulgem, 2005). Most importantly, using *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Tao *et al.* (2003) demonstrated that late compatible

*These authors contributed equally to this work.

and early incompatible interactions show similar responses. Considering regulator genes that were identified in Arabidopsis by a forward genetic approach, most of the time they were shown to be differentially expressed upon infection. For example, the *EDS5* gene was shown to be induced by virulent and avirulent strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Arabidopsis (Nawrath *et al.*, 2002).

With the completion of rice and *Magnaporthe grisea* genomes, rice blast disease has become a model of choice to study host reactions in monocotyledons (Dean *et al.*, 2005). Several large-scale approaches have been used to identify genes and proteins that are differentially expressed upon infection by *M. grisea*, other pathogens and related stresses. This led to the identification of genes that are potentially differentially regulated upon infection by *M. grisea* (Kim *et al.*, 2001; Rauyaree *et al.*, 2001; Jantasuriyarat *et al.*, 2005) or related conditions (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: Chu *et al.*, 2004; Rice Yellow Mottle Virus: Ventelon-Debout *et al.*, 2003). Differential cDNA libraries (SSH: Xiong *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2004; Shim *et al.*, 2004; differential display: Kim *et al.*, 2000) combined with reverse northern were also used. Although it is always difficult to compare such different studies, some common elements emerge:

- As in other systems, incompatible and compatible interactions seem to differ mainly quantitatively (Wen *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004).
- Except for classical defence genes such as *PR1*, *PR3* (chitinases), *PBZ1* and metallothionein, there are few overlaps between the differentially expressed genes isolated in these studies. From reports on genes differentially expressed upon infection, it appears that only 18% were found in at least two independent studies (Droc *et al.*, 2006; this study). This suggests that our knowledge of defence response in rice is far from complete.
- Among the common patterns of gene expression emerging from those studies, several found repression of genes involved in photosynthesis (Zhou *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004; Shim *et al.*, 2004).
- Many of the genes identified appear to belong to multigene families, and appropriate tools, such as quantitative RT-PCR, are needed to study their specific expression.
- Besides transcriptional factors, such as WRKYs (Zhou *et al.*, 2002) and MYBs (Xiong *et al.*, 2001), and with the exception of the *Mlo* gene (Zhou *et al.*, 2002), no major regulator gene known to be required for disease resistance in Arabidopsis or monocotyledons was found in the thousands of genes differentially expressed upon infection.

We are currently studying the interaction between rice resistance gene *Pi33* (Berruyer *et al.*, 2003) and *M. grisea* avirulence gene *ACE1* (Böhnert *et al.*, 2004). In rice cultivar IR64, the *Pi33* gene belongs to a 5 Mb introgression from *O. rufipogon* located on the small arm of *O. sativa* chromosome 8 (E. Ballini *et al.*, unpublished). *Pi33* is also found in some wild rice species, suggesting an ancient origin (E. Ballini *et al.*, unpublished). However, the *Pi33* resistance gene is probably a classical resistance gene as it maps to a small interval from the rice chromosome 8 containing several classical resistance gene analogues (Berruyer *et al.*, 2003; E. Ballini *et al.*, unpublished). Avirulence gene *ACE1* encodes a putative hybrid protein between a polyketide synthase and a nonribosomal peptide synthase. Mutagenesis studies strongly support the hypothesis that the metabolite produced by this enzyme, rather than the enzyme itself, is the avirulence molecule (Böhnert *et al.*, 2004). Such an interaction between a fungal metabolite and a disease resistance gene is unique among known avirulence/resistance interactions in fungi (Böhnert *et al.*, 2004). As this interaction is original, this avirulence gene may induce plant defence mechanisms that differ from other avirulence/resistance interactions, at least during the early phases of recognition. Therefore we decided to explore rice defence reactions in this particular avirulence/resistance interaction. Nontargeted differential gene expression was performed using DNA chips to identify genes up- or down-regulated during early stages in this interaction. Additionally, the expression of genes known to be required for disease resistance in rice or other plants was monitored during *ACE1/Pi33* interaction. Whereas more than 50 regulator genes required for disease resistance are known in dicots (Hammond-Kosack & Parker, 2003), only 14 have been described in cereals, mostly in barley (Ayliffe & Lagudah, 2004), and rice, including rice genes *SPL11* (Zeng *et al.*, 2004), *OsMT2b* (Wong *et al.*, 2004), *OsRac1* (Ono *et al.*, 2001), *NRR* (Chern *et al.*, 2005), *SPL7* (Yamanouchi *et al.*, 2002), *OsEDR1* (Kim *et al.*, 2003), *OsEREBP* (Kim *et al.*, 2000), *OsLSD1* (Wang *et al.*, 2005) and *OsMAPK6* (Lieberherr *et al.*, 2005). Some of these disease resistance regulator genes are differentially expressed upon infection. The corresponding rice genes are probably involved in the control of disease resistance and as such have been used as putative markers of disease resistance induction in rice. Finally, there is a need for the identification of novel genes in rice that are differentially expressed during infection. Our strategy towards this goal involves a combination of DNA chip-based differential screening and an expression survey of selected disease resistance regulator genes. This first screening was followed by the monitoring of the expression of a selected number of differentially expressed genes during different compatible/incompatible interactions to identify patterns specific of *Pi33/ACE1* interaction.

Materials and Methods

Plants and fungus

Oryza sativa L. (rice) plants and *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr were grown and inoculated as described in Berruyer *et al.* (2003). The IR64 rice cultivar contains the *Pi33* resistance gene matching the *ACE1* avirulence gene. The *M. grisea* PH14 isolate does not contain the *ACE1* avirulence gene unless transformed here with the 31C12 cosmid (Böhnert *et al.*, 2004). The Nipponbare/CL26 interaction is incompatible (Fig. 1c).

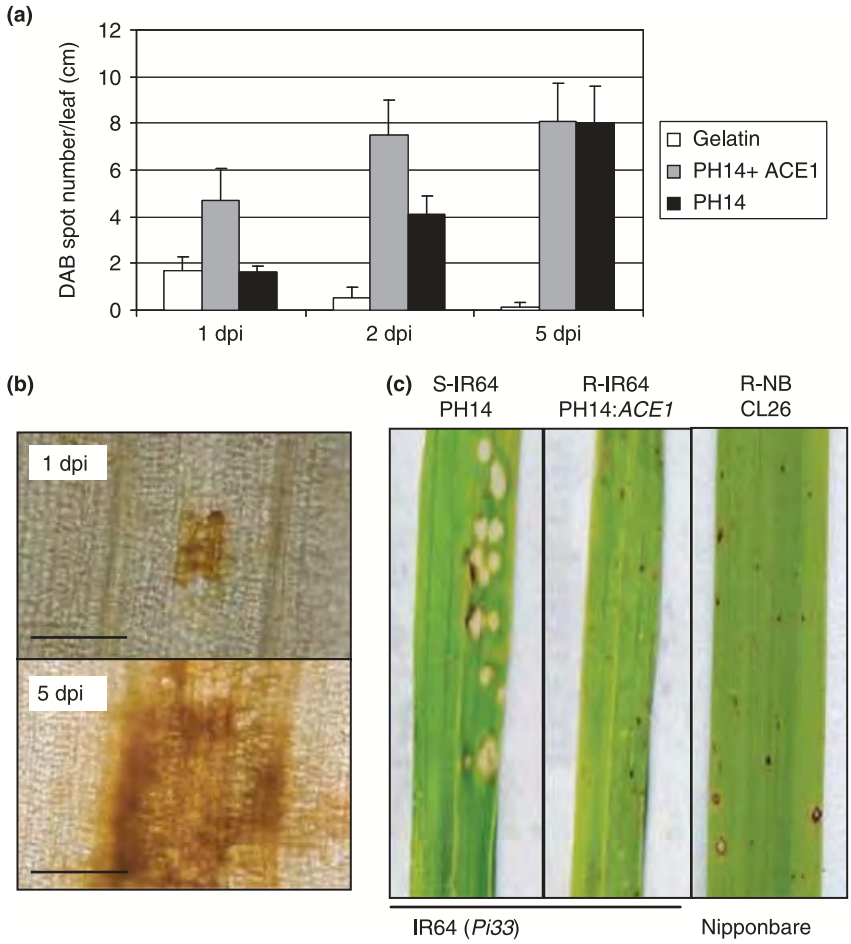


Fig. 1 Oxidative burst in the *Pi33/ACE1* interaction. IR64 plants carrying the *Pi33* resistance gene were inoculated with an avirulent strain (PH14:*ACE1*), virulent strain (PH14) or gelatin control. (a) The oxidative burst (H_2O_2) was measured using DAB staining. Spots where DAB staining was visible were counted under the microscope and normalized by measuring the length of leaf observed. The mean (+ SD) of two independent experiments is shown. (b) Examples of DAB staining in the incompatible interaction (1 day postinoculation (dpi)) and in the compatible interaction (5 dpi). Bar, 1 mm (c) Symptoms 5 dpi in resistant IR64 (inoculated with PH14:*ACE1* isolate), susceptible IR64 (inoculated with PH14 isolate) and resistant Nipponbare inoculated with CL26.

DAB staining

The protocol for DAB staining was adapted from Thordal-Christensen *et al.* (1997). Diaminobenzidine (Sigma D-8001) was solubilized to 1 mg ml^{-1} of water, excised leaves were dipped overnight (in the dark) and tissues were cleared with ethanol/chloroform (4 : 1) overnight at room temperature.

RNA extraction

For RT-QPCR applications, frozen tissue was ground in liquid nitrogen. Approximately 500 µl of powder was then treated with 500 µl TLES buffer (Tris PH8100 mM, LiCl 100 mM, EDTA PH8 10 mM and SDS 1%), 500 µl warmed water saturated phenol (Acros Organics, Halluin, France), and vortexed for 30 s. A volume of 500 µl of $CHCl_3$: isoamylalcohol (24 : 1) was then added and the samples were vortexed for 30 s. The samples were then centrifuged (30 min, 13 000 rpm) and the RNA was precipitated from the supernatant overnight using one volume LiCl 4 M. RNA pellets were then washed with 70% ethanol and resuspended in distilled water.

Primer design

Primers were designed using the Beacon designer v4 software (Stratagene, La Jolla, CA, USA). When it was available, the sequence used was the full-length cDNA (Kikuchi *et al.*, 2003). In order to reduce specificity issues, available 3′ UTR sequences were chosen for primer design. Primer pairs for which efficiency was between 90 and 110%, as determined by standard amplification curves, were used for expression studies. Specific amplification was checked using denaturation curves of QPCR products. All primer sequences are available in the Supplementary Material (Table S1). The rice genome sequence (TIGR pseudomolecules v3) was used for annotation and BLAST searches using the OryGenesDB database and tool box (http://orygenesdb. cirad.fr/; Droc *et al.*, 2006).

RT and QPCR

RNA samples (5 µg) were denaturated for 5 min at 65°C with oligo dT (3.5 µM) and dNTP (1.5 µM). They were then subjected to reverse transcription for 60 min at 37°C with

				best blastp on rice		best reciprocal blastp on arabidopsis		differential expression [d]	
gene	**accession**	**origin**	**putative function**	**Tigr**	**identity (%) [a]**	**hit [b]**	**BBMH [c]**	**summary**	**reference**
COI1	AAN31713	arabidopsis	F-box protein	Os01g63420	65	NP_565919.1	yes	induced by JA	Xie et al (1998)
DIR1	NM_124224	arabidopsis	LTP binding	Os07g18750	44	DIR1	yes	repressed by avir Pseudomonas	Maldonado et al (2002)
EDS5	NM_1263	arabidopsis	MATE-transporter	Os02g02980	59	NP_565509.1	no	induced by vir and avir Pseudomonas	Nawrath et al (2002)
JIN	NM_102998	arabidopsis	MYC transcription factor	Os10g42430	48	JIN	yes	induced by JA	Lorenzo et al (2004)
SSI2	AF395441	arabidopsis	stearoyl ACP desaturase	Os01g69080	85	SSI2	yes	induced by JA	Kachroo et al (2001)
SABP2	AY485932	tobacco	SA binding protein	Os01g57770	52	-	na	TMV inducible	Kumar and Klessig (2003)
OsSGT1	na	rice	RAR1 interactor	Os01g43540	-	-	na	induced vir and avir P. parasitica	Azevedo et al (2006)
OsLSD1	na	rice	Zn-finger transcription factor	Os08g06280	-	-	na	no	Wang et al (2005)
OsSPL7	na	rice	Heat stress transcription factor	Os05g45410	-	-	na	no	Yamanouchi et al (2002)
OsNRR	na	rice	NPR1 interactor	Os01g03940	-	-	na	unchanged X. oryzae oryzae	Chern et al (2005)
OsEDR1	na	rice	MAPKK	Os03g06410	-	-	na	SA JA inducible	Kim et al (2003)
OsMAPK6	na	rice	MAPK	Os05g49140	-	-	na	not induced by elicitor	Lieberherr et al (2005)
OsMT2b	na	rice	metallothionein	Os05g02070	-	-	na	repressed by blast elicitor	Wong et al (2004)
OsSPL11	na	rice	U-box & ARM repeat protein	Os12g38210	-	-	na	induced by vir and avir blast	Zeng et al (2004)

Tableau Supplémentaire S1 Origin of the 14 known and putative rice genes required for disease resistance

Publication	Biotic stress type	accessions
Cooper et al, PNAS 2003	Magnaporthe grisea, jasmonate, cultivar japonica Nipponbare	90
Fujiwara et al, Plant Physiol 2006	sphingolipids+CA-OsRac1, rice suspension cultured cells	184
Güimil et al, PNAS 2005	M grisea + Glomus intraradices, cultivar japonica Nipponbare, roots	21
Han et al, Mol Cells 2004	M grisea, blast-resistant mutant derivative of cultivar japonica Sanghaehyanghyella	26
Jantasuriyarat et al, Plant Physiol 2005	most induced M. grisea	160
Jantasuriyarat et al, Plant Physiol 2005	most repressed M. grisea	124
Jantasuriyarat et al, Plant Physiol 2005	most induced SPL11	41
Jantasuriyarat et al, Plant Physiol 2005	most repressed SPL11	49
Kim et al, MPMI 2001	M grisea, cultivar japonica Nipponbare	18
Lu et al, TAG 2003	M grisea, cultivars indica 75-1-127 (Pi9(t)), IR31917, C101A51 (Pi2(t)) & CO39	47
Ramalingam et al, MPMI 2003	candidate genes from different studies	10
Shim et al, Plant Cell Rep 2004	M grisea, O minuta, compatible interaction	178
Shimono et al, J Gen Plant Pathol 2003	Probenazole + M grisea, cultivar japonica Nipponbare & isogenic line Kantoh BL6 (Pi-b)	10
Tsunezuka et al, MPMI 2005	Lesion mimic cdr2	28
Wen et al, Mol Gen Genomics 2003	X oryzae & M grisea, multiple cultivars	12
Xiong et al, MPMI 2001	M grisea, japonica cultivar Drew	22
Xiong et al, MPMI 2001	M grisea, japonica cultivar Drew	34
Zhou et al, Science in China 2002	X oryzae & M grisea, indica cultivars Minghui 63, C101A51 (Pi2(t)), IRBB10 (Xa10) & IRBB13 (xa13)	11
PubMed	Rhizoctonia solani, cultivar indica 9311	13
PubMed	miscellaneous	53
	total accessions	1131
	total non redundant rice locus	923
	redundant accessions	208 (18%)

Tableau Supplémentaire S2 Origin of the rice defence gene list

200 U of reverse transcriptase M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), and DTT (5 mM) in the appropriate buffer. Two microlitres of cDNA (dilution 1/100) were then used for quantitative RT-PCR. Quantitative RT-PCR mixtures contained PCR buffer, dNTP (0.25 mM), $MgCl_2$ (2.5 mM), forward and reverse primers (300 μM), 1 U of HotGoldStar polymerase and SYBR Green PCR mix as per the manufacturer's recommendations (Eurogentec, Seraing, Belgium). Amplification was performed as follows: 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 15 s, 62°C for 1 min and 72°C for 30 s; then 95°C for 1 min and 55°C for 30 s. The quantitative RT-PCR (QRT-PCR) reactions were performed using a MX3000P machine (Stratagene) and data were extracted using the MX3000P software. The amount of plant RNA in each sample was normalized using actin (Os03g50890; Table S1) as internal control. For Table 1 and Fig. 3, the calculation of expression ratios (infected vs gelatin treated plants) was done according to Pfaffl (2001). For Fig. 1, the calculation of gene expression was done using the measured efficiency for each gene (data not shown).

Microarray hybridization

RNA labelling and hybridization of the Agilent oligo chips (70-mers; Agilent G4137A, http://www.chem.agilent.com) were carried out according to the manufacturer's protocol. One dye swap and two technical repeats were done for each comparison.

Rice defence gene list

Genes for which differential expression is available in publications were from Cooper *et al.* (2003), Fujiwara *et al.* (2006), Han *et al.* (2004), Kim *et al.* (2001), Lu *et al.* (2004), Ramalingam *et al.* (2003), Shim *et al.* (2004), Shimono *et al.* (2003), Wen *et al.* (2003), Xiong *et al.* (2001), Zhou *et al.* (2002), Tsunezuka *et al.* (2005), Güimil *et al.* (2005) and Jantasuriyarat *et al.* (2005). This represents a total of 923 nonredundant rice genes for 1131 accession numbers (Table S2). For Jantasuriyarat *et al.*, 2005), it is important to mention that only a subset of

Table 1 Expression ratios of genes selected from targeted approach and microarray. Two to three experiments were used to establish mean ratios between infected and control plants (gelatin). Ratios above 1.5 and below –1.5 are highlighted in bold and italic, respectively. Ratios between 1 and –1 were adjusted to 1. R, resistant; S, susceptible

		R-IR64 (*Pi33*) PH14:*ACE1*/gelatin		R-Nipponbare CL26/gelatin		S-IR64 (*Pi33*) PH14/gelatin	
Gene	Putative function	1 dpi	2 dpi	1 dpi	2 dpi	1 dpi	2 dpi
Genes from targeted approach							
Os08g06280	*OsLSD1*	***–3.8***	***–1.9***	**1.6**	***–2.1***	**1.7**	***–1.6***
Os07g18750	*DIR1*	***–2.7***	**2.6**	**1.8**	***–3.2***	**2.7**	–1.4
Os01g69080	*SSI2*	***–3.1***	**1.9**	1.0	***–1.9***	1.4	1.0
Os05g02070	*OsMT2b*	***–2.0***	**1.6**	1.0	***–1.6***	–1.2	1.0
Os05g49140	*OsMAPK6*	***–3.5***	**2.2**	–1.1	–1.4	**2.8**	**1.5**
Os01g43540	*OsSGT1*	1.0	**1.5**	1.2	***–1.9***	1.0	1.0
Os12g38210	*OsSPL11*	1.0	**1.6**	1.0	***–1.7***	1.0	–1.1
Os03g06410	*OsEDR1*	1.0	**2.7**	**2.1**	***–1.6***	**2.6**	1.0
Os01g57770	*SABP2*	1.0	**1.9**	**1.6**	**1.5**	**2.5**	1.0
Os05g45410	*OsSPL7*	**2.5**	***–3.2***	1.3	**2.4**	1.2	1.0
Os01g03940	*OsNRR*	**2.0**	**1.7**	1.0	**1.8**	***–3.9***	**2.5**
Os02g02980	*EDS5*	**1.6**	**1.5**	1.0	1.0	1.0	1.0
Os01g63420	*COI1*	**6.3**	**1.5**	1.4	***–1.7***	1.0	***–2.8***
Os10g42430	*JIN*	**1.9**	1.2	1.0	–1.1	**3.8**	***–2.3***
Genes from microarray							
Os07g48020	Peroxidase	**4.3**	**10.2**	***–2.0***	**5.6**	**1.9**	**2.5**
Os04g24220	Wall-associated kinase	**2.0**	**4.9**	***–2.5***	**1.6**	**16.2**	1.0
Os10g40930	Oxidoreductase	**2.4**	**3.1**	1.0	**2.0**	**2.6**	1.3
Os03g16950	33 kDa secretory protein	**2.3**	**2.9**	1.0	**5.0**	**4.8**	–1.6
Os07g35560	Chitinase	**5.1**	**24.8**	1.0	**4.8**	**16.2**	**8.1**
Os01g58290	Subtilase family protein	**2.6**	**7.7**	1.0	**2.7**	**2.5**	**3.0**
Os01g64110	Chitinase III	**2.2**	**2.9**	1.0	**2.0**	**3.2**	1.0
Os06g03580	Zinc finger, C3HC4 type	**2.1**	**3.9**	1.0	**1.5**	**7.0**	**1.7**
Os11g39370	LRR kinase	**1.7**	**2.3**	–1.1	**1.5**	**15.6**	**1.5**
Os09g09830	Heavy metal-associated domain	**2.2**	**2.5**	**1.6**	1.0	**6.8**	–1.3
Os06g50300	Hsp90	**1.9**	**2.2**	1.0	1.0	**2.8**	1.0
Os02g08440	WRKY09	**2.5**	**5.9**	1.0	1.0	**1.8**	1.0
Os08g10310	LRR kinase	**7.0**	**4.1**	1.0	–1.3	**3.1**	1.0

Name	TIGR locus	forward	reverse	
Os01g58290	Os01g58290	CGGAAAGTTGCTGACCCATTCG	GCTCGCCGCACCTTGATTG	Tab.1
Os01g64110	Os01g64110	CGTGCGCGACCGGTAA	TGGCCCTTGCCGAACA	Tab.1
Os02g08440	Os02g08440	CCGAGCAGATGGCGATGAC	AGGCAGAGACAGGAGAGGATG	Tab.1
Os04g08630	Os04g08630	CCGGAGATGAAGAAGATGGA	TGCAATGCAACATCAAATCA	Tab.1
Os03g16950	Os03g16950	GGCAACGTCGCAGGCATCAC	CGCCGCAGTATTGACCGAACC	Tab.1
Os04g24220	Os04g24220	GGAACTGAAGGTGAAGCCAATC	GACACTCTCTATCTCTTCGTCAGTAGCT	Tab.1
Os06g03580	Os06g03580	CTGCGTACCCTCTCCATCTGA	TGGCAGCCTCTTCGTTGTT	Tab.1
Os06g50300	Os06g50300	CCAGGACAGCGAGAGCGAGAG	TCCGCCTCCTCCTTGATGTTGG	Tab.1
Os07g01960	Os07g01960	GGCTTGTGGCTGCGTATG	TCCCTGTGACTGCGAACC	Tab.1
Os07g35560	Os07g35560	CCAGACGGGACGGAGGTTTAC	AGATGCGTGTGCGACCAAGG	Tab.1
Os07g48020	Os07g48020	ACGACGCCCAACGCCTTC	CTTCCAGCAACGAACGCATCC	Tab.1
Os08g10310	Os08g10310	GATGTTGAGGTGGCAGAGGTAG	GATTGTTGGTGATTGAGTGAGAGG	Tab.1
Os08g31860	Os08g31860	TCCCACGTCAACAAGATCAA	CGCATGCATACAACATAATCA	Tab.1
Os09g09830	Os09g09830	GATGCGGCGTACTCACATTGTC	ATCTGGCAGCATGATGGACTGG	Tab.1
Os10g40930	Os10g40930	TCAGCAGCACTCTTCCACTATCC	GCAGGTTCATGTCAGTATCTCAGG	Tab.1
DIR1	Os07g18750	GGCTAGAACTGCTACAGGGATAG	ATGACAACACTCTCACAGACAAAC	Tab.1
EDS5	Os02g02980	CACGGCTAGGTTCAGTTCCAATG	CCAATCCATCAGCAAGAAGAGACG	Tab.1
JIN	Os10g42430	CAGCGTCTCCGTGGTCAAGG	GGCGATGCGGGTGTAGAGC	Tab.1
COI1	Os01g63420	TAAGTTGTTGTCACTTGTTCTACG	TACATCTCGCAACCAAAGCAC	Tab.1
OsEDR1	Os03g06410	ATGGGTGGACCTGTGAAAGATGC	AGTAGGGCACGGTGACGAGAC	Tab.1
OsLSD1	Os08g06280	TACAGACCAGAAGCCCAGCAG	CTCCATATCCAAGGAAGGAAGGTG	Tab.1
OsMAPK6	Os05g49140	GCCGTTCAATATGGTGTTTCAAG	GCCTTATATCTGGGTGGATGGG	Tab.1
OsMT2b	Os05g02070	ACCGTCGTCGTCGTTGTCAG	GCATGAGGAGATGGAGCAGGAG	Tab.1
OsNRR	Os01g03940	TGCGGGTGCTCACGGATTAC	ACACACAAGGAGGACAAGGC	Tab.1
OsSGT1	Os01g43540	TCATCACTTGGCTGGAGATTTCG	TTCGGAGCAAAGATTCAGATAACG	Tab.1
OsSPL11	Os12g38210	ACAGCCCAGCGTCTCAATACC	TCAGCACACAAGCATGGAAACC	Tab.1
OsSPL7	Os05g45410	CGGATTAGAGGCTTGCGTGTTAC	GCACAGTAGTCAGCGGATAGAAC	Tab.1
SABP2	Os01g57770	CCTGCTGTTAATGAAGTCAATCTG	AAAGAAGACCGAATTATTCCAAGC	Tab.1
SSI2	Os01g69080	GTGTTACTACTGTCCGTGCTTGTC	ATGCCCTCAGTTCATTTGGTCAAC	Tab.1
Os01g37910	Os01g37910	GCACCAGCATTCCCTCCAAC	ACAGTTCTTCAGACTTCACCTACG	Fig.3
Os11g13670	Os11g13670	TGGTGGTGAGTGAGTGATTGG	ATTATTGACGACCTCATCCTACAC	Fig.3
Os09g27030	Os09g27030	TGCCCACGGATTAGTTCCATTG	ACCTACACAACCATACAGGAGAAG	Fig.3
Os04g38410	Os04g38410	CGTTCCTCAAGTGGTACAG	GTGGCGTTGGAGAAGTTC	Fig.3
Os08g33820	Os08g33820	TCGCTCAAGTCTACCTTCC	TCTTCGTCAGCACCTCAG	Fig.3
Os07g37240	Os07g37240	CGGAGAAGAGGCTGTACC	AATTAAGAGGATGAGGAGAAGG	Fig.3
Os01g52240	Os01g52240	CGCCAATGCCAAGGTGTTC	GGTGTCCCAGCCGTAGTC	Fig.3
Os01g41710	Os01g41710	GTTCGGCTTCTTCGTCCAG	CGCATCGTCGTCAACCTAG	Fig.3
actin	Os03g50890	GCGTGGACAAAGTTTTCAACCG	TCTGGTACCCTCATCAGGCATC	

Tableau Supplémentaire S3 QPCR primers

the genes from this publication was included in our database. We focused on ESTs that showed important induction or repression ratios between infected and control library. This represents 201 induced and 100 repressed EST in infected or *SPL11* lesion mimic mutant tissues.

Origin of putative and known rice disease regulators

This corresponds to five genes originally described in Arabidopsis (*COI1*, *DIR1*, *EDS5*, *JIN* and *SSI2*), one gene from barley (*SGT1*; Schulze-Lefert & Vogel, 2000) and one from tobacco (SA binding protein SABP2; Slaymaker *et al.*, 2002; Kumar & Klessig, 2003). The original sequences were blasted on the rice genome to identify the best blast mutual hit. Seven known rice disease regulators were also included (*OsLSD1*, *OsSPL7*, *OsEDR1*, *OsMAPK6*, *OsMT2b*, *OsNRR* and *OsSPL11*). Details can be found in Table S3.

Results

Induction of defence mechanisms during *ACE1*/*Pi33* interaction

Since *ACE1*/*Pi33* interaction differs from other gene-for-gene relationships, we first examined whether classical defence mechanisms were triggered in this interaction. Plants of rice indica cultivar IR64 carrying *Pi33* were inoculated with *M. grisea* isogenic strains containing *ACE1* (PH14-*ACE1*) or not (PH14). A typical HR was observed as soon as 2–3 dpi (days postinoculation) in the incompatible interaction (IR64/PH14-*ACE1*). Disease symptoms were visible after 5 dpi only in the compatible interaction (IR64/PH14, Fig. 1c). Using DAB staining, we observed that an oxidative burst was triggered as early as 1 dpi in the incompatible interaction (Fig. 1a,b). This burst was also detected at 2 dpi in the compatible interaction. Thus, as in other gene-for-gene interactions (Wojtaszek, 1997), the *Pi33*/*ACE1* interaction is associated with an oxidative burst which is a hallmark of plant defence response. We monitored the expression of *PBZ1* (Midoh & Iwata, 1996; Kim *et al.*, 2004) and *PR1b* (Agrawal *et al.*, 2000), which are classical pathogen-induced rice defence genes. In the incompatible *Pi33*/*ACE1* interaction, *PBZ1* and *PR1b* were induced at a high level at 2 dpi, whereas they were induced to a lower degree in the compatible interaction (Fig. 2). According to these criteria, the *ACE1*/*Pi33* interaction is similar to other known gene-for-gene interactions, as there is an earlier and stronger induction of defence mechanisms (oxidative burst and induction of *PR* genes) in the incompatible interaction than in the compatible one.

Identification of differentially expressed genes during *Pi33*/*ACE1* interaction using a targeted approach

Among the large number of Arabidopsis and rice genes involved in disease resistance (Hammond-Kosack & Parker, 2003; see Introduction), we picked 14 (Table 1) to examine whether these genes would be differentially regulated in the *Pi33*/*ACE1* interaction. These genes were selected on the basis that they showed, to some extent, differential expression upon microbial infection (Table S3). The corresponding homologous genes were identified in the rice genome and their expression was monitored by quantitative RT-PCR during the incompatible *Pi33*/*ACE1* interaction as well as other resistant or susceptible situations. Data presented in Table 1 demonstrate that our strategy to select known regulator genes was fruitful to identify genes that are differentially regulated in the *Pi33*/*ACE1* interaction. At 1 dpi, five genes (*OsSPL7*, *EDS5*, *JIN*, *OsNRR*, *COI1*) were up-regulated upon infection in a *Pi33*/*ACE1* incompatible interaction, five (*OsLSD1*, *OsMAPK6*, *SSI2*, *OsMT2b* and *DIR1*) were down-regulated, while four (*OsSGT1*, *OsSPL11*, *OsEDR1* and *SABP2*) were not differentially expressed (Table 1). The majority of these genes were also up-regulated at 2 dpi, except for *OsLSD1* and *OsSPL7*, which were both repressed. Most of these genes were also differentially expressed during the other incompatible interaction tested between cv. Nipponbare and *M. grisea* isolate CL26. However, striking differences were observed. First, differential expression occurred earlier in the incompatible *Pi33*/*ACE1*

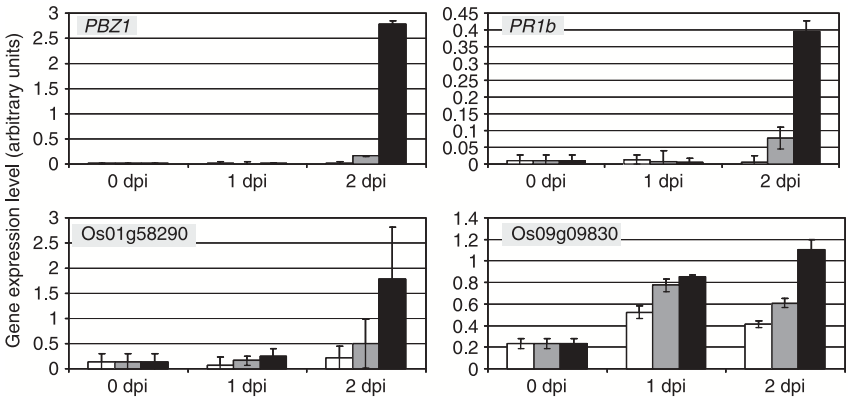


Fig. 2 Examples of gene induction in the *Pi33*/*ACE1* interaction. Gene expression was measured (0, 1 and 2 dpi) by QRT-PCR. Open bars, gelatin control; grey bars, susceptible IR64 (*Pi33*)/PH14; closed bars, resistant IR64 (*Pi33*)/PH14:*ACE1*. Gene expression level (arbitrary units) was normalized using actin (Os03g50890) as an internal reference (see Materials and Methods section). The mean (+ SD) of three experiments is shown. *PBZ1*: Os12g36880, similar to D38170; *PR1b*: Os01g28450, similar to U89895.

interaction than in the other incompatible interaction. Second, one gene (*EDS5*) was only regulated in the incompatible *Pi33*/*ACE1* interaction and not in the other interactions tested. Finally, *OsSPL11* and *OsSGT1* showed opposite differential expression between Nipponbare/CL26 and *Pi33/ACE1* incompatible interactions. These results suggest that the types of genes and their expression pattern strongly differ between *Pi33*/*ACE1*- and Nipponbare/CL26 incompatible interactions.

Identification of genes differentially expressed during *Pi33/ACE1* interaction using microarrays

We have used microarrays to systematically identify the rice genes differentially expressed during *ACE1/Pi33* interaction. To focus on the initial phases of infection, three differential hybridizations were performed: incompatible (IR64/PH14-*ACE1* vs IR64/gelatin-treated) at two time points (1 and 2 dpi), and compatible (IR64/PH14 vs IR64/gelatin-treated) at 2 dpi. Four technical replicates were performed allowing a statistical comparison based on a Student *t*-test on absolute values from hybridization signals. With a *P*-value of 0.05, we identified 79 and 22 oligo probes up-regulated, respectively, more than 1.5-fold and twofold compared with noninoculated leaves. Down-regulated oligo probes were found in large numbers with 876 and 51 genes being down-regulated 1.5-fold and twofold, respectively, compared with noninoculated leaves. With regard to these values, to select genes for further studies, we applied 1.5-fold and twofold ratios as cut-offs for up- and down-regulated genes, respectively. Based on these criteria, 57 nonredundant genes are up-regulated (ratio > 1.5; Table 2) and 42 nonredundant genes are down-regulated genes (ratio < −2; Table 3). Among up-regulated genes, 18 (67%) were common to incompatible and compatible interactions (Table 2), whereas only one (1/42) down-regulated gene was common to incompatible and compatible interactions (Table 3).

We selected 24 genes from the 57 up-regulated genes (Table 2) for further studies of their expression using QRT-PCR. With the exception of Os12g30820, the expression of 23/24 genes (96%) was confirmed with RNA from the original microarray hybridization, suggesting that the quality of the microarray hybridization is correct. However, only 13 of these 23 genes (Table 1) were also up-regulated in the three independent biological replicates. Genes encoding leucin-rich repeat (LRR) proteins, protein kinases and receptor-like kinases are a major class of genes up-regulated during *Pi33/ACE1* interaction (11% of the 57 up-regulated and none of the 42 down-regulated genes; Tables 2, 3). These results strongly suggest that genes involved in signal perception and transduction are well represented among up-regulated genes. The putative functions of down-regulated genes are strikingly different as they are related to photosynthesis (chlorophyll a/b binding proteins; discussed later), protein degradation (proteases, 5%) and water transport (aquaporins, 5%). The survey of published data on induction of rice genes upon infection identifies a set of 923 genes differentially expressed upon infection by *M. grisea* or *X. oryzae oryzae* (Droc *et al.*, 2006; also see http://orygenesdb.cirad.fr). Using this 'rice defence gene list' as a reference (Table S2), we show that 86% of the induced genes (Table 2) and 75% of the repressed genes (Table 3) in *Pi33*/*ACE1* interaction were not described as such before.

Genes up-regulated during *Pi33/ACE1* interaction

Several contrasting biological situations were used to survey the expression patterns of 13 up-regulated genes from the microarray experiment validated by QRT-PCR (Table 1). We used the original IR64 (*Pi33*) and isolate PH14:*ACE1* interaction as well as another incompatible interaction between Nipponbare japonica cultivar and avirulent *M. grisea* isolate CL26 (Fig. 1c). As a compatible interaction, we used the infection of IR64 rice cultivar by virulent *M. grisea* isolate PH14. Most of these 13 genes had induction ratios close to two, although two transcripts had higher ratios (10 and 25 for peroxidase Os07g48020 and chitinase Os07g35560, respectively). Results obtained from a representative experiment are displayed for two representative patterns in Fig. 2. The Os01g58290 pattern is representative of five genes (Os07g48020, Os07g35560, Os06g03580, Os11g39370 and Os01g58290) up-regulated in both incompatible *Pi33*/*ACE1* and compatible IR64/PH14 interactions. Os09g09830 is representative of eight genes (Os04g24220, Os10g40930, Os03g16950, Os01g64110, Os08g10310, Os06g50300, Os02g08440 and Os09g09830) still up-regulated in incompatible *Pi33*/*ACE1* at 2 dpi while their up-regulation decreases in the corresponding compatible interaction. The incompatible interaction between rice cv. Nipponbare and *M. grisea* isolate CL26 was used to survey the expression of these genes in another gene-for-gene interaction besides *Pi33/ACE1*. Overall, the expression patterns of these genes are quite different in incompatible *Pi33/ACE1* (IR64) and Nipponbare interactions (Table 1), as only a single gene Os09g09830 displayed induction in both incompatible interactions. Other genes up-regulated in *Pi33/ACE1* interaction were either not differentially expressed (Os06g50300, Os02g08440 and Os08g10310) or up-regulated only later (2 dpi) in a Nipponbare/CL26 interaction.

Genes down-regulated in *Pi33/ACE1* interaction

Among the 42 genes down-regulated during *Pi33/ACE1* interaction, we identified two proteases (Table 3) and four more in an extended data set (data not shown). The expression patterns of three of these proteases (Os01g37910, Os11g13670 and Os09g27030) were surveyed using QRT-PCR. These three proteases were shown to be down-regulated in the three biological replicates corresponding to a *Pi33*/*ACE1* interaction

Table 2 Expression ratios of 57 genes up-regulated in IR64 (*Pi33*)/PH14–*ACE1* interaction. Genes in italic and bold are those chosen for QRT-PCR confirmation of data. All except Os12g30820 were confirmed. The genes for which accession numbers are indicated in bold are those presented in more detail in Table 1. Expression ratios in bold are those for which ratios are > 1.5 with an associated *P*-value < 0.05

			IR64 (*Pi33*) PH14:*ACE1*/gelatin		PH14/gelatin	
Agilent ID	TIGR ID	Putative function	1 dpi	2 dpi	2 dpi	Existing published expression
AZR05361	Os10g36840	Putative ferulate-5-hydroxylase (*Oryza sativa*)	**1.60**	1.19	1.18	
AZR06995	*Os04g40990*	oj991113_30.4 (*Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group))	**1.59**	–1.57	–1.9	
AZR06501	**Os02g08440**	WRKY transcription factor, putative, expressed	**1.52**	1.31	1.36	
AZR06000	*Os07g34520*	Isocitrate lyase, putative, expressed	**1.81**	**1.51**	–1.42	Yes
AZR06114	*Os07g26110*	EST	**1.61**	**1.58**	1.47	
AZR00863	*Os01g71350*	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII precursor	**1.53**	**1.86**	**2.27**	
AZR07054	Os03g58790	ATPase 2, putative, expressed	**1.50**	**1.78**	**2.52**	
AZR03696	–	EST	1.85	**1.66**	1.52	
AZR03556	Os01g70490	Potassium transporter 5, putative, expressed	1.32	**1.84**	1.43	
AZR00830	Os02g40240	Leucine Rich Repeat family protein, expressed	–1.13	**1.71**	1.46	Yes
AZR02616	Os04g56430	Receptor-like protein kinase 6, putative, expressed	–1.99	**2.10**	–1.09	Yes
AZR04751	**Os07g35560**	Chitinase	1.31	**3.16**	**4.08**	Yes
AZR02475	*Os04g10160*	Cytochrome P450 CYP99A1, putative, expressed	1.16	**3.08**	**2.12**	
AZR05828	Os11g37950	Barwin, putative, expressed	–1.09	**2.97**	**4.55**	
AZR01867	*Os01g42410*	PDR5-like ABC transporter, putative, expressed	1.21	**2.35**	**1.90**	
AZR04963	**Os04g24220**	Wall-associated kinase	–1.15	**2.29**	**2.19**	
AZR01852	*Os12g36110*	Calmodulin-binding protein, putative, expressed	1.02	**2.09**	**2.05**	
AZR06906	Os12g36850	Pathogenesis-related protein PR-10b (*Oryza sativa* subsp. *indica*)	–1.29	**1.98**	**2.10**	Yes
AZR03112	Os10g28080	Class III chitinase	1.21	**1.95**	**3.11**	
AZR00482	**Os06g03580**	Zinc finger, C3HC4 type family protein	1.26	**1.95**	**2.17**	
AZR06915	Os01g73200	Peroxidase 12 precursor, putative, expressed	1.24	**1.93**	**1.63**	
AZR02876	**Os10g40930**	Putative dioxygenase	1.14	**1.78**	**1.94**	
AZR01190	Os03g03440	Putative phosphoribosylanthranilate transferase	1.06	**1.76**	**1.57**	Yes
AZR06021	*Os12g30820*	EST	–1.29	**1.73**	**1.73**	
AZR05864	Os01g58290	Subtilase family protein	–1.19	**1.73**	**2.13**	
AZR06128	Os10g39140	Oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein, expressed	1.16	**1.67**	**1.72**	
AZR05868	Os05g43170	Calreticulin-3 precursor, putative, expressed	1.05	**1.60**	**2.03**	
AZR06450	**Os08g10310**	LRR kinase	1.23	1.60	**2.67**	
AZR02673	**Os11g39370**	LRR kinase	1.10	1.54	**1.75**	
AZR01833	**Os07g48020**	Peroxidase 2 precursor, putative, expressed	1.45	1.46	**2.65**	Yes
AZR06271	Os01g41820	Cytochrome P450 family protein, expressed	–1.20	1.46	**1.63**	

No claim to original French government works.
Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

Table 2 *continued*

Agilent ID	TIGR ID	Putative function	IR64 (*Pi33*) PH14:*ACE1*/gelatin 1 dpi	IR64 (*Pi33*) PH14:*ACE1*/gelatin 2 dpi	PH14/gelatin 2 dpi	Existing published expression
AZR01976	**Os09g09830**	Heavy metal-associated domain containing protein, expressed	1.01	1.40	**1.51**	
AZR04574	Os06g40650	Copine family protein, expressed	–1.07	1.38	**1.53**	
AZR06379	Os03g16390	Putative Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein	1.03	1.37	**1.75**	
AZR02349	*Os02g57280*	EST	–1.03	1.37	**2.51**	
AZR00712	Os03g24930	Protein kinase APK1A, chloroplast precursor, putative, expressed	1.47	1.36	**1.97**	
AZR02733	Os01g55810	P0403C05.2 (*Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group))	–1.26	1.35	**1.52**	
AZR05843	Os04g30330	Protein kinase domain containing protein, expressed	–1.15	1.31	**1.51**	
AZR04276	Os01g38250	Putative peptidylprolyl isomerase (*Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group))	–1.42	1.30	**1.73**	
AZR05576	Os01g57070	Putative zinc protease (*Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group))	1.09	1.27	**1.66**	
AZR01394	Os11g44560	Protein kinase domain containing protein, expressed	–1.02	1.26	**1.52**	
AZR00912	Os08g17680	Stromal cell-derived factor 2-like protein precursor, putative, expressed	1.05	1.26	**1.61**	
AZR04350	Os03g05620	Phosphate: H^+ symporter family protein, expressed	1.17	1.25	**1.63**	
AZR00322	Os01g38240	Putative peptidylprolyl isomerase (*Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group))	–1.35	1.21	**1.59**	
AZR06659	Os01g48610	B1144G04.12 (*Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group))	1.10	1.21	**1.84**	
AZR02294	**Os06g50300**	Hsp90	–1.04	1.19	**1.55**	
AZR03995	**Os03g16950**	33 kDa secretory protein, putative, expressed	1.46	1.19	**1.73**	
AZR03912	Os04g15690	'Unknown protein; protein id: At1g76020.1 (*Arabidopsis thaliana*)'	–1.03	1.15	**1.79**	
AZR01286	Os03g55240	Cytochrome P450 family protein, expressed	–1.29	1.12	**1.53**	
AZR01338	**Os01g64110**	Chitinase III	1.39	1.11	**1.87**	
AZR06427	Os05g16740	SHR5-receptor-like kinase, putative, expressed	–1.34	1.07	**1.53**	
AZR05757	Os04g52640	SHR5-receptor-like kinase, putative, expressed	–1.16	–1.06	**1.64**	
AZR03333	*Os10g10130*	Calcium binding EGF domain containing protein, expressed	–1.12	–1.09	**1.53**	Yes
AZR01858	*Os11g25260*	GDA1/CD39 family protein, expressed	–1.65	–1.10	**1.96**	
AZR00341	Os01g68740	Expressed protein	–1.20	–1.13	**1.54**	
AZR04075	Os11g25330	GDA1/CD39 family protein, expressed	–1.70	–1.19	**1.73**	
AZR06380	Os01g64120	Ferredoxin-2, chloroplast precursor, putative, expressed	–1.14	–1.22	**1.52**	

No claim to original French government work
Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

Table 3 Expression ratios of 42 genes down-regulated in the IR64 (*Pi33*)/PH14–*ACE1* interaction. Expression ratios in bold are those for which ratios are less than –2 with associated *P*-value < 0.05

Agilent ID	TIGR ID	Putative function	IR64 (*Pi33*) PH14: *ACE1*/gelatin		PH14/gelatin	Existing published expression
			1 dpi	2 dpi	2 dpi	
AZR05140	Os01g52240	Chlorophyll a/b binding protein 2, chloroplast precursor, putative, expressed	**–3.01**	–1.41	–1.15	
AZR02014	–	Starch branching enzyme rbe4 (*Oryza sativa*)	**–2.70**	–1.24	–1.22	
AZR00828	Os04g38410	Chlorophyll a/b binding protein CP24 10B, chloroplast precursor, putative	**–2.63**	–1.59	–1.14	Yes
AZR06965	Os01g41710	Chlorophyll a/b binding protein 2, chloroplast precursor, putative, expressed	**–2.58**	–1.46	–1.01	
AZR03292	Os11g32650	Chalcone synthase, putative, expressed	**–2.38**	–1.99	–1.24	Yes
AZR05281	Os03g20700	Magnesium-chelatase subunit H family protein, expressed	**–2.26**	1.04	1.29	
AZR03049	Os05g50750	AAA-type ATPase family protein, putative, expressed	**–2.22**	–1.25	–1.16	
AZR01577	Os05g44210	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase, putative, expressed	**–2.15**	–1.05	–1.00	
AZR06951	Os06g06290	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein, expressed	**–2.12**	–1.82	1.03	
AZR06598	Os03g52630	Endo-1,4-beta-glucanase Cel1, putative, expressed	**–2.09**	–1.31	–1.30	
AZR06715	Os04g36720	Ferric reductase-like transmembrane component family protein, putative, expressed	**–2.05**	–1.81	–1.33	
AZR05987	Os02g18450	GTP-binding protein TypA/BipA homolog, putative, expressed	**–2.00**	–1.10	1.09	Yes
AZR00656	Os03g14650	EST	**–2.62**	**–2.14**	–1.25	
AZR00910	Os10g21280	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor, putative, expressed	–1.66	**–2.34**	–1.04	Yes
AZR05721	Os09g38090	Expressed protein	–1.56	**–2.09**	–1.10	
AZR06984	Os07g10840	Seed imbibition protein, putative, expressed	–1.56	**–2.58**	–1.27	
AZR04269	Os02g13060	EST	–1.55	**–2.06**	–1.28	
AZR05446	Os07g15460	Metal transporter Nramp1, putative, expressed	–1.55	**–2.55**	–1.72	
AZR02650	Os01g46720	Protein kinase domain containing protein, expressed	–1.53	**–2.11**	–1.35	
AZR00021	Os10g36000	Remorin, C-terminal region family protein, expressed	–1.52	**–2.14**	–1.05	
AZR05968	Os08g04430	EST	–1.48	**–2.13**	–1.16	
AZR05929	Os12g02340	Nonspecific lipid-transfer protein 3 precursor, putative, expressed	–1.47	**–2.34**	–1.09	
AZR04727	Os08g02630	Expressed protein	–1.43	**–2.09**	1.00	
AZR05211	Os10g18340	Unknown protein (*Oryza sativa*) >gil22655738lgblAAN04155.1	–1.36	**–2.31**	–1.40	Yes
AZR05823	Os04g47220	Aquaporin RWC3, putative, expressed	–1.36	**–2.08**	–1.24	
AZR06883	–	EST	–1.34	**–2.59**	–1.10	
AZR04953	Os02g33070	Hypothetical protein	–1.30	**–2.01**	1.08	
AZR03973	Os01g52750	Subtilisin N-terminal Region family protein, expressed	–1.29	**–2.04**	–1.02	
AZR05034	Os12g02570	EST	–1.25	**–2.02**	–1.11	
AZR02228	Os06g22960	Aquaporin TIP-type RB7-18C, putative, expressed	–1.25	**–2.04**	–1.33	Yes
AZR00145	Os01g14950	Importin alpha-1b subunit, putative, expressed	–1.22	**–2.59**	–1.10	Yes
AZR04300	Os01g74410	Myb-like DNA-binding domain containing protein, expressed	–1.21	**–2.27**	–1.12	Yes
AZR00994	Os07g05360	Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplast precursor, putative, expressed	–1.20	**–2.13**	–1.71	Yes
AZR04934	–	EST	–1.18	**–2.25**	–1.20	
AZR03740	Os06g48500	EST	–1.17	**–2.02**	–1.01	
AZR05305	Os06g21210	Glycine rich protein family protein, expressed	–1.17	**–3.73**	–1.33	Yes
AZR02117	Os12g25200	Chloride channel protein CLC-a, putative, expressed	–1.16	**–2.04**	–1.15	
AZR00543	Os01g63190	Multicopper oxidase family protein, expressed	–1.02	**–2.45**	1.08	
AZR03226	–	Hypothetical protein (*Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group))	1.20	**–2.27**	–1.22	
AZR05231	Os08g35760	Auxin-binding protein ABP20 precursor, putative, expressed	1.31	**–2.99**	–1.84	
AZR03028	Os04g40630	TAZ zinc finger family protein, expressed	–1.71	**–2.55**	**–2.18**	Yes
AZR00960	Os02g52390	Peptidase M16 inactive domain containing protein, expressed	–1.60	1.44	**–3.08**	Yes

No claim to original French government works.
Journal compilation © *New Phytologist* (2007)

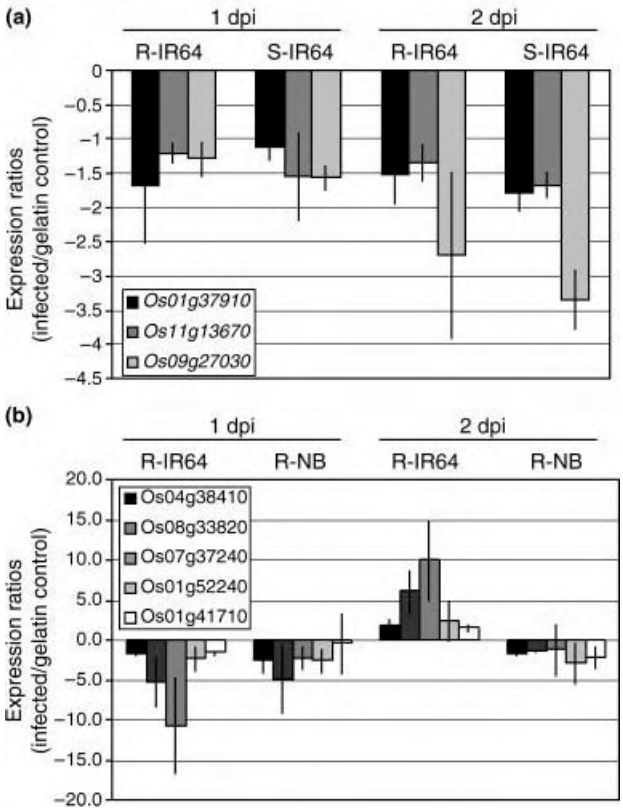


Fig. 3 Repression of proteases (a) and chlorophyll a/b binding genes (b) during *Magnaporthe grisea* infection. Expression ratios between infected and control plants (gelatin). R, resistant IR64 (*Pi33*)/PH14:*ACE1* vs gelatin control; S, susceptible IR64 (*Pi33*)/PH14 vs gelatin control; R-NB, resistant Nipponbare/CL26 vs gelatin. QRT-PCR measurements were made on two to three independent experiments.

at 2 dpi (Fig. 3a) and in a Nipponbare/CL26 incompatible interaction (data not shown). However, they were also down-regulated in the compatible interaction at 2 dpi (Fig. 3a), suggesting that this differential expression is related to *M. grisea* infection rather than to the induction of specific plant defence mechanisms. Three chlorophyll a/b binding proteins were also repressed during *Pi33/ACE1* interaction at 1 dpi (Table 3). In addition, the microarray experiment indicated that 11 chlorophyll a/b binding proteins were also repressed at 1 dpi in the *Pi33/ACE1* interaction (data not shown). We monitored the expression of five chlorophyll a/b binding genes by QRT-PCR (Fig. 3b) and observed an early repression of these genes in both *Pi33/ACE1* and Nipponbare/CL26 incompatible interactions. By contrast, these chlorophyll a/b binding genes were up-regulated at 2 dpi in the *Pi33/ACE1* incompatible (Fig. 3b) and IR64/PH14 compatible interactions (data not shown). This suggests that down-regulation of chlorophyll a/b binding genes is associated with the onset of plant defence mechanisms.

Discussion

The *Pi33/ACE1* interaction triggers classical defence reactions

Given the unusual nature of the *ACE1* avirulence gene (Böhnert *et al.*, 2004), we wondered whether rice defence mechanisms triggered by this avirulence gene would be novel. As shown in Fig. 1(a,b), an oxidative burst was triggered by the *ACE1/Pi33* incompatible interaction as in other plant disease defence reactions (Wojtaszek, 1997) and classical plant defence genes including known PR proteins were induced (Fig. 2). Transcriptome analysis of early stages of plant fungal interactions (1–2 dpi) further supported the assertion that this gene-for-gene interaction is similar to others, as most genes differentially expressed during the *Pi33/ACE1* incompatible interaction were also differentially expressed in susceptible plants (Fig. 2, Tables 1, 2), although later, as frequently observed for plant defence genes (Tao *et al.*, 2003). An additional characteristic of expression patterns observed during the *Pi33/ACE1* incompatible interaction is the high frequency of down-regulated genes (Table 3). For example, two putative cysteine proteases (Os01g37910 and Os09g27030) and one putative serine protease (Os11g13670) were down-regulated in both incompatible *Pi33/ACE1* and compatible IR64/PH14 interactions (Fig. 3a). Repression of cysteine proteases in rice leaves infected by *M. grisea* has already been observed in rice. Fujiwara *et al.* (2006) showed that another rice cysteine protease, Os01g67980, is repressed by a constitutively active form of *OsRac1* mimicking disease resistance. Cooper *et al.* (2003) also showed that jasmonic acid, a key signalling molecule during rice disease resistance, repressed the expression of the same cysteine protease Os09g27030 we identified as differentially expressed during infection. In susceptible plants, down-regulation of cysteine proteases may be triggered by the pathogen in order to suppress basal rice defence. Triggering of resistance by the *Pi33/ACE1* interaction is possibly not sufficient to counteract this defence suppression induced at early stages of the infection process. Finally, chlorophyll a/b binding genes were early and strongly down-regulated in the *Pi33/ACE1* interaction (Fig. 3b), a phenomenon already observed in other gene-for-gene interactions between rice and *M. grisea* or *X. oryzae* (Zhou *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004; Shim *et al.*, 2004).

Microarray analysis of the *Pi33/ACE1* interaction identifies novel putative defence genes

A transcriptomics analysis of the *ACE1/Pi33* interaction was performed using Agilent DNA chips, allowing the identification of rice genes that are differentially expressed upon infection (Tables 2, 3). About 80% (79 genes) of the regulated genes we identified were not previously reported, even though similar analyses of rice leaves infected with *M. grisea* or *X. oryzae* were

performed with a comparable number of genes being analysed (Chu *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004; Jantasuriyarat *et al.*, 2005). This is consistent with the observation that, among the 923 rice genes putatively involved in disease resistance (Droc *et al.*, 2006; see Table S2), only 18% were reported as being differentially expressed during disease resistance in at least two studies. Indeed, whereas resistance gene analogues (LRR proteins and receptor-like kinases) represented 11% of the 57 up-regulated genes we identified (Table 2), none were reported in Lu *et al.* (2004) or Jantasuriyarat *et al.* (2005). Eleven of the novel rice genes we identified (Table 1) encode protein functions known to be up-regulated in rice or other plants upon infection (Van Loon *et al.*, 2006). For example, 15 WRKY transcription factors were recently reported to be up-regulated upon *M. grisea* infection (Ryu *et al.*, 2006). However, the WRKY09 gene we identified was not reported in this study, probably as a result of the lower sensitivity of the technique used. Similarly, an Arabidopsis wall-associated kinase (Wak1) was shown to be involved in plant defence (He *et al.*, 1998) and a wall-associated like kinase (WAKL22) was shown to be required for disease resistance in Arabidopsis infected with *Fusarium* (Diener & Ausubel, 2005), and hsp90 proteins (for review, see Sangster & Queitsch, 2005), subtilase and proteases (Xia, 2004) have frequently been found to be involved in or associated with induction of plant disease resistance.

The *Pi33/ACE1* interaction regulation pathway

Global comparison between *Pi33/ACE1* and Nipponbare/CL26 incompatible interactions provided some information on the *Pi33* regulation pathway. Most regulated genes were differentially expressed in both *Pi33/ACE1* and Nipponbare/CL26 incompatible interactions (Table 1), although differential expression was observed earlier in the *Pi33/ACE1* interaction than in the Nipponbare/CL26 interaction for 15 out of 17 genes (Table 1). This observation suggests that the *Pi33* resistance gene is more efficient at triggering a defence response than the resistance gene from Nipponbare involved in the recognition of CL26. This could be related to the fact that the *ACE1* gene is only expressed at an early stage of infection (1 dpi) during penetration of the fungus into the first host epidermal cell (Böhnert *et al.*, 2004). However, we cannot rule out the possibility that background differences for both host and pathogen may lead to these results.

Five genes differentially expressed in the two incompatible interactions tested were not expressed in the compatible interaction IR64/PH14 (*SSI2*, *OsMT2b*, *OsSGT1*, *OsSPL11* and *OsSPL7*; Table 1). These genes encode known or potential regulators of disease resistance (Table S3) involved in signalling disease resistance: the *SGT1* gene is involved in the initial recognition between the avirulence product and the resistance gene (Azevedo *et al.*, 2006), the *OsMT2b* gene is a negative regulator of the oxidative burst (Wong *et al.*, 2004), and the three genes, *SSI2*, *OsSPL7* and *OsSPL11*, are negative regulators of cell death (Kachroo *et al.*, 2001; Yamanouchi *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2004). Their expression during additional compatible interactions needs to be tested to establish if they are good markers of rice resistance.

Genes up- or down-regulated specifically during a particular gene-for-gene incompatible interaction have been only rarely described, despite numerous attempts. As such, only one gene (a proteasome component, BF108345) was identified as being up-regulated specifically during resistance triggered by an avirulent *M. grisea* isolate recognized by rice resistance gene *Pi1(t)* (Wen *et al.*, 2003). In our experiments, we could only identify one gene, *EDS5*, as specifically up-regulated during the *Pi33/ACE1* incompatible interaction (Table 1). Interestingly, the *EDS5* gene codes a MATE (multidrug and toxin extrusion) transporter protein (Nawrath *et al.*, 2002). How this relates to the secondary metabolite produced by the *ACE1* gene will need further investigation. More gene-for–gene interactions need to be tested to establish if *EDS5* is a specific marker of rice *Pi33*-triggered resistance by *ACE1*.

Acknowledgements

EV is funded by a joint grant from INRA and the Languedoc-Rousillon region. EB is funded by the French Ministry of Research. Part of this work was supported by the French programme Génoplante (projects OsCrR1 and B8). We thank V. Chalvon, C. Michel and L. Fontaine for technical assistance. We thank Christophe Périn for critical reading of the manuscript.

References

Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS. 2000. Rice (*Oryza sativa* L.) OsPR1b gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **278**: 290–298.

Ayliffe MA, Lagudah ES. 2004. Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Annals of Botany* **94**: 765–773.

Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J, Takahashi A, Noel L, Sadanandom A, Casais C, Parker J, Shirasu K. 2006. Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO Journal* **25**: 2007–2016.

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH, Tharreau D. 2003. Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE*1. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 11310–1147.

Böhnert HU, Fudal I, Dioh W, Tharreau D, Notteghem JL, Lebrun MH. 2004. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. *Plant Cell* **16**: 2499–2513.

Chern M, Canlas PE, Fitzgerald HA, Ronald PC. 2005. Rice NRR, a negative regulator of disease resistance, interacts with Arabidopsis NPR1 and rice NH1. *Plant Journal* **43**: 623–635.

Chu Z, Ouyang Y, Zhang J, Yang H, Wang S. 2004. Genome-wide analysis of defense-responsive genes in bacterial blight resistance of rice mediated by the recessive Royal gene *Xa13*. *Molecular Genetics and Genomics* **271**: 111–120.

Cooper B, Clarke JD, Budworth P, Kreps J, Hutchison D, Park S, Güimil S, Dunn M, Luginbuhl P, Ellero C, Goff SA, Glazebrook J. 2003. A

network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**: 4945–4950.

Dangl JL, Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.

Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E *et al.* 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**: 980–986.

Diener AC, Ausubel FM. 2005. Resistance to *Fusarium oxysporum*1, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* **171**: 305–321.

Droc G, Ruiz M, Larmande P, Pereira A, Piffanelli P, Morel JB, Dievart A, Courtois B, Guiderdoni E, Perin C. 2006. OryGenesDB: a database for rice reverse genetics. *Nucleic Acids Research* **34**: D736–740.

Eulgem T. 2005. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science* **10**: 71–78.

Fujiwara M, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K. 2006. Proteomics of Rac GTPase signaling reveals its predominant role in elicitor-induced defense response of cultured rice cells. *Plant Physiology* **140**: 734–745.

Güimil S, Chang HS, Zhu T, Sesma A, Osbourn A, Roux C, Ioannidis V, Oakeley EJ, Docquier M, Descombes P, Briggs SP, Paszkowski U. 2005. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**: 8066–8070.

Hammond-Kosack KE, Parker JE. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177–193.

Han CU, Lee CH, Jang KS, Choi GJ, Lim HK, Kim JC, Ahn SN, Choi JE, Cha JS, Kim HT, Cho KY, Lee SW. 2004. Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. *Molecules and Cells.* **17**: 462–468.

He Z-H, He D, Kohorn BD. 1998. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant Journal* **14**: 155–163.

Jantasuriyarat C, Gowda M, Haller K, Hatfield J, Lu G, Stahlberg E, Zhou B, Li. H, Kim HYuY, Dean RA, Wing RA, Soderlund C, Wang GL. 2005. Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. *Plant Physiology* **138**: 105–115.

Kachroo P, Shanklin J, Shah J, Whittle EJ, Klessig DF. 2001. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 9448–9453.

Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, Doi K, Kishimoto N, Yazaki J, Ishikawa M, Yamada H, Ooka H, Hotta I, Kojima K, Namiki T, Ohneda E, Yahagi W, Suzuki K, Li CJ, Ohtsuki K, Shishiki T, Otomo Y *et al.* 2003. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science* **301**: 376–379.

Kim JA, Agrawal GK, Rakwal R, Han KS, Kim KN, Yun CH, Heu S, Park SY, Lee YH, Jwa NS. 2003. Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryzasativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of Arabidopsis AtEDR1, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300**: 868–876.

Kim S, Ahn IP, Lee YH. 2001. Analysis of genes expressed during rice–*Magnaporthe grisea* interactions. *Molecular Plant and Microbe Interaction* **14**: 1340–1346.

Kim ST, Kim SG, Hwang du H, Kang SY, Kim HJ, Lee BH, Lee JJ, Kang KY. 2004. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* **4**: 3569–3578.

Kim CY, Lee SH, Park HC, Bae CG, Cheong YH, Choi YJ, Han C, Lee SY, Lim CO, Cho MJ. 2000. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Molecular Plant and Microbe Interaction* **13**: 470–474.

Kumar D, Klessig DF. 2003. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**: 16 101–16 106.

Lieberherr D, Thao NP, Nakashima A, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K. 2005. A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice 1[w]. *Plant Physiology* **138**: 1644–1652.

Lu G, Jantasuriyarat C, Zhou B, Wang GL. 2004. Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 525–534.

Midoh N, Iwata M. 1996. Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiology* **37**: 9–18.

Nawrath C, Heck S, Parinthawong N, Metraux JP. 2002. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**: 275–286.

Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K. 2001. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 759–764.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: e45.

Ramalingam J, Vera Cruz CM, Kukreja K, Chittoor JM, Wu JL, Lee SW, Baraoidan M, George ML, Cohen MB, Hulbert SH, Leach JE, Leung H. 2003. Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Molecular Plant and Microbe Interaction* **16**: 14–24.

Rauyaree R, Choi W, Fang E, Blackmon B, Dean RA. 2001. Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Pathology* **2**: 347–354.

Ryu HS, Han M, Lee SK, Cho JI, Ryoo N, Heu S, Lee YH, Bhoo SH, Wang GL, Hahn TR, Jeon JS. 2006. A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Report* **25**: 836–847.

Sangster TA, Queitsch C. 2005. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current Opinions in Plant Biology* **8**: 86–92.

Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM. 2000. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**: 11655–11660.

Schulze-Lefert P, Vogel J. 2000. Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science* **5**: 343–348.

Shim KS, Cho SK, Jeung JU, Jung KW, You MK, Ok SH, Chung YS, Kang KH, Hwang HG, Choi HC, Moon HP, Shin JS. 2004. Identification of fungal (*Magnaporthe grisea*) stress-induced genes in wild rice (*Oryza minuta*). *Plant Cell Reports* **22**: 599–607.

Shimono M, Yazaki J, Nakamura K, Kishimoto N, Kikuchi S, Iwano M, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, Nishiguchi M. 2003. cDNA microarray analysis of gene expression in rice plants treated with probenazole, a chemical inducer of disease resistance. *Journal of General Plant Pathology* **69**: 76–82.

Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF. 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**: 11640–11645.

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F. 2003. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317–330.

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H_2O_2 in plants: H_2O_2 accumulation in papillae and

hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *Plant Journal* **11**: 1187–1194.

Tsunezuka H, Fujiwara M, Kawasaki T, Shimamoto K. 2005. Proteome analysis of programmed cell death and defense signaling using the rice lesion mimic mutant cdr2. *Molecular Plant and Microbe Interaction* **18**: 52–59.

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162.

Ventelon-Debout M, Nguyen TT, Wissocq A, Berger C, Laudie M, Piegu B, Cooke R, Ghesquiere A, Delseny M, Brugidou C. 2003. Analysis of the transcriptional response to Rice Yellow Mottle Virus infection in *Oryza sativa* indica and japonica cultivars. *Molecular Genetics and Genomics* **270**: 253–262.

Wang L, Pei Z, Tian Y, He C. 2005. OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Molecular Plant and Microbe Interaction* **18**: 375–384.

Wen N, Chu Z, Wang S. 2003. Three types of defense-responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. *Molecular Genetics and Genomics* **269**: 331–339.

Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**: 681–692.

Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K. 2004. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology* **135**: 1447–1156.

Xia Y. 2004. Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cell Microbiology* **6**: 905–913.

Xiong L, Lee MW, Qi M, Yang Y. 2001. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Molecular Plant and Microbe Interaction* **14**: 685–692.

Yamanouchi U, Yano M, Lin H, Ashikari M, Yamada K. 2002. A rice spotted leaf gene, Spl7, encodes a heat stress transcription factor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**: 7530–7535.

Zeng LR, Qu S, Bordeos A, Yang C, Baraoidan M, Yan H, Xie Q, Nahm BH, Leung H, Wang GL. 2004. Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell* **16**: 2795–2808.

Zhou B, Peng K, Chu Z, Wang S, Zhang Q. 2002. The defense-responsive genes showing enhanced and repressed expression after pathogen infection in rice (*Oryza sativa* L.). *Science in China* **45**: 449–467.

Supplementary Material

The following supplementary material is available for this article online:

Table S1 QPCR primers

Table S2 Origin of the rice defence gene list

Table S3 Origin of the 14 known and putative rice genes required for disease resistance

Text S1 MIAME checklist and raw data

This material is available as part of the online article from: http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.2006.01971.x
(This link will take you to the article abstract).

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

About *New Phytologist*

- *New Phytologist* is owned by a non-profit-making **charitable trust** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to open access for our Tansley reviews. Complete information is available at **www.newphytologist.org**.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as-ready' via *OnlineEarly* – our average submission to decision time is just 30 days. Online-only colour is **free**, and essential print colour costs will be met if necessary. We also provide 25 offprints as well as a PDF for each article.
- For online summaries and ToC alerts, go to the website and click on 'Journal online'. You can take out a **personal subscription** to the journal for a fraction of the institutional price. Rates start at £131 in Europe/$244 in the USA & Canada for the online edition (click on 'Subscribe' at the website).
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (**newphytol@lancaster.ac.uk**; tel +44 1524 594691) or, for a local contact in North America, the US Office (**newphytol@ornl.gov**; tel +1 865 576 5261).

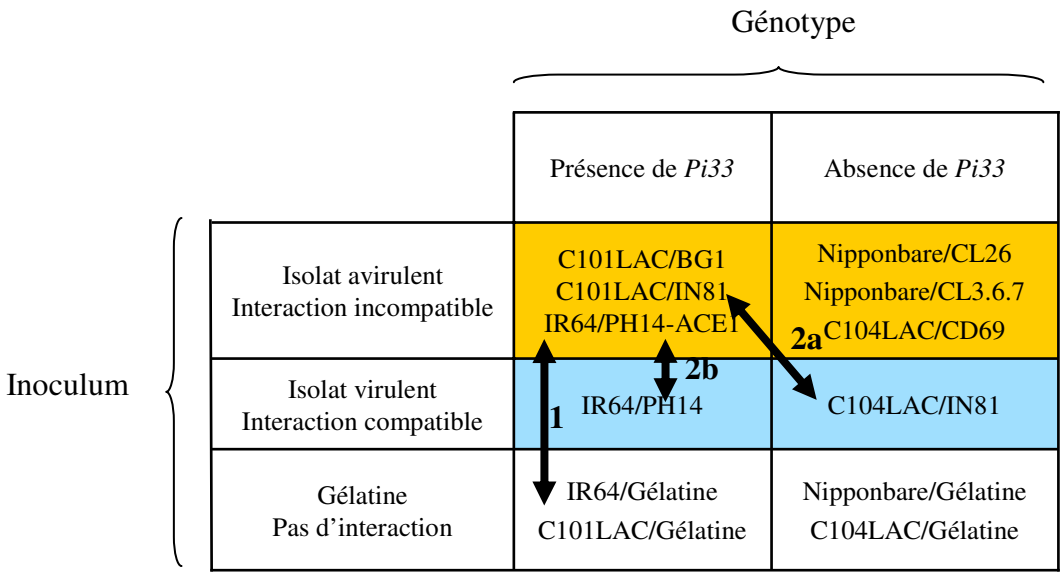


Tableau 4.2. Schéma récapitulatif des conditions expérimentales et des différentes comparaisons. Les conditions expérimentales varient en fonction du génotype et de l'inoculum. Des rapports d'expression de gènes sont effectués entre deux conditions.
Le premier type de rapport (1) compare une différence d'expression entre une condition inoculée et un témoin non inoculé. Le gène sera considéré comme induit ou réprimé ou non différentiellement exprimé au cours de l'infection. Le deuxième type de rapport (2) compare une différence d'expression entre une condition inoculée incompatible et une condition inoculée compatible. Deux cas sont possibles : (2a) la comparaison se fait entre deux lignées isogéniques qui diffèrent par la présence de *Pi33*. (2b) la comparaison se fait entre deux inoculums isogéniques qui diffèrent par la présence de *ACE1*. Le gène sera considéré comme sur-exprimé ou sous-exprimé ou non différentiellement exprimé au cours de l'infection.

Origine	Type de comparaison	Nombre de gènes identifiés	Nombre de gènes sélectionnés pour la validation en QPCR	Nombre de gènes dont l'expression est validée en QPCR
Littérature		14 gènes	14 gènes	14 gènes
Expérience "Agilent"	Inoculé / Non inoculé	57 gènes induits et 42 gènes réprimés	24 gènes induits	13 gènes induits
Expérience "B8"	Inoculé Incompatible / Inoculé Compatible	10 gènes sur-exprimés et 37 gènes sous-exprimés	6 gènes sur-exprimés et 15 gènes sous-exprimés	4 gènes sur-exprimés et 3 gènes sous-exprimés
Total non redondant		152 gènes	59 gènes	34 gènes

Tableau 4.3. Bilan des gènes identifiés dans la littérature et par analyse de transcriptome.

IV.3 Influence de Pi33 sur les réactions de défense

L'une des thématiques de l'équipe est l'analyse de l'expression des gènes au cours de l'infection par *M. oryzae*. Notre objectif était de mettre en évidence l'activité de nouveaux gènes de défense, spécifiques de la résistance, voire spécifiques de l'interaction *ACE1/Pi33*. En effet, du fait de son originalité, l'interaction *ACE1/Pi33* pourrait induire des mécanismes de défense différents de ceux impliqués dans d'autres interactions de type gène-pour-gène, au moins durant les phases précoces suivant la reconnaissance. A partir d'analyses d'hybridation sur puces à ADN, nous avons défini un jeu de gènes marqueurs des réactions de défense. L'expression de ces gènes a ensuite été comparée dans des interactions incompatibles faisant intervenir différents couples gène R/gène AVR, dont *Pi33/ACE1*. Nous souhaitions ainsi vérifier la spécificité de ces gènes comme marqueur de la résistance et évaluer l'impact du fond génétique sur leur expression.

Pour cette étude, des rapports d'expression de gènes sont calculés en comparant l'expression de gènes dans différentes conditions pour lesquelles les deux variables sont le génotype de la variété et l'inoculum. Deux types de comparaisons sont alors possibles : une condition inoculée par rapport à un témoin non inoculé (inoculé avec de la gélatine) et une condition inoculée incompatible par rapport à une condition inoculée compatible (Tableau 4.2). Dans le premier cas, les gènes différentiellement exprimés lors de l'interaction avec *M. oryzae* sont identifiés. Dans le deuxième cas, des gènes dont l'expression est spécifique de la réaction incompatible sont identifiés. Dans ce qui suit, un gène sera considéré comme « induit » (et respectivement « réprimé ») lorsque son expression est supérieure (et respectivement inférieure) lors d'une inoculation par rapport à un témoin non inoculé. Un gène sera considéré comme « sur-exprimé » (et respectivement « sous-exprimé ») lorsque son expression est supérieure (et respectivement inférieure) lors d'une interaction incompatible par rapport à une interaction compatible.

IV.3.1 Résultats

a <u>Création d'un jeu de gènes spécifiques des réactions de défense</u>

Notre objectif était d'établir un jeu de gènes spécifiques de la résistance qui pourrait ensuite être utilisé comme marqueur des réactions de défense dans le cadre de réactions incompatibles. Pour établir ce jeu de gènes, nous nous sommes tout d'abord appuyés sur les gènes décrits dans la littérature comme étant nécessaires à la mise en place de la résistance. Il s'agissait notamment de régulateurs décrits chez *A. thaliana* dont les orthologues possibles ont pu

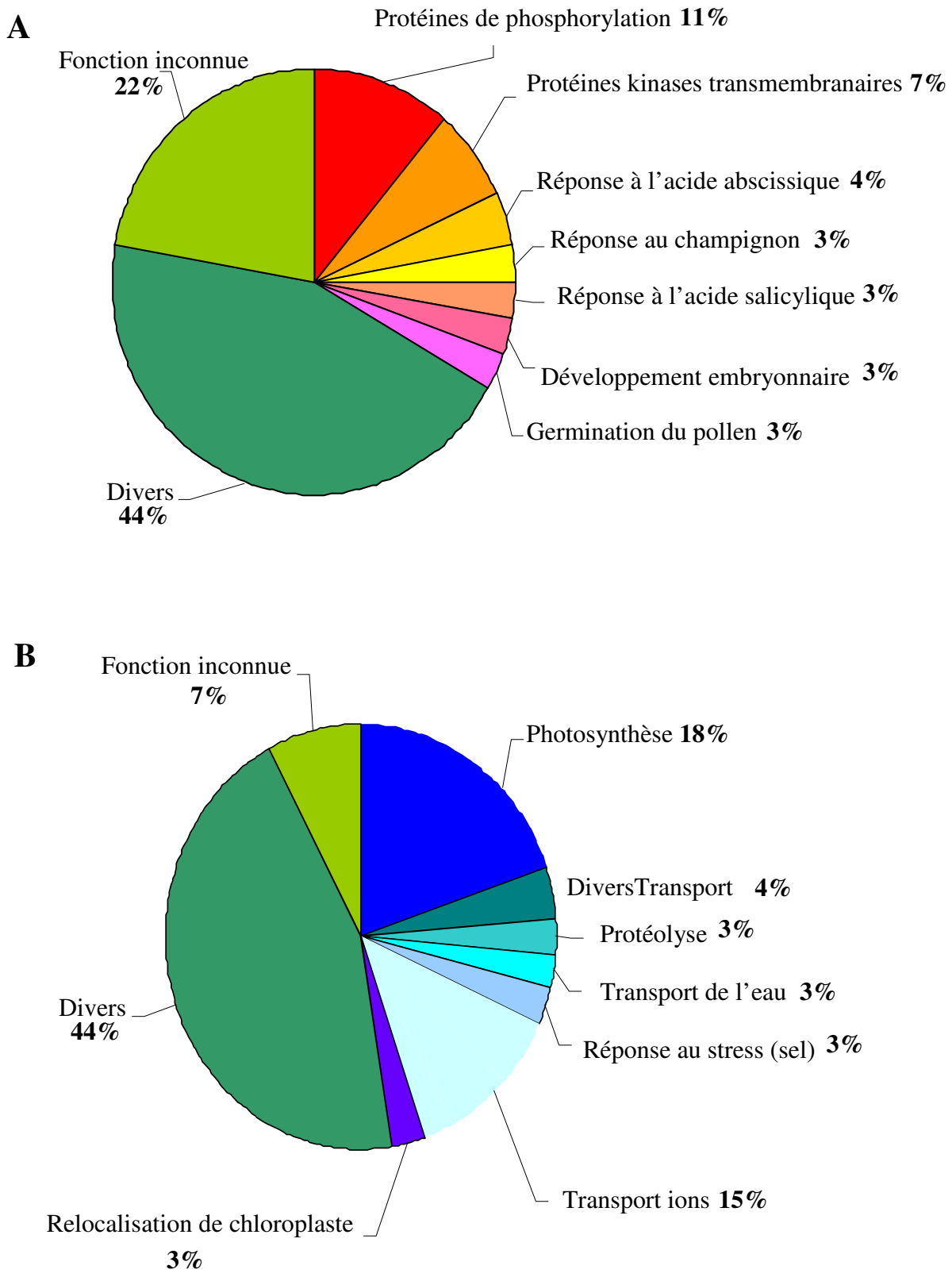


Figure 4.4. Annotation des gènes différentiellement exprimés lors de l'interaction gène-pour-gène *Pi33/ACE1*.
Les 57 gènes induits (**A**) et les 49 gènes réprimés (**B**) issus de Vergne *et al*., 2007 ont été annotés par l'outil d'annotation de TIGR (http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/batch_download.shtml). Les processus biologiques sont indiqués. La catégorie « divers » regroupe les catégories pour lesquelles un seul gène était présent.

être identifiés chez *O. sativa* (Vergne *et al.*, 2007). Quatorze gènes ont ainsi été sélectionnés (Tableau 4.3).

Nous avons ensuite complété ce jeu de gènes par un jeu de gènes supposés spécifiques de la résistance et, plus particulièrement, de l'interaction *ACE1/Pi33*. Pour cela deux séries d'analyses du transcriptome à l'aide de puces à ADN ont été produites. Ces expériences sur puces à ADN ont été réalisées dans le cadre d'un projet Génoplante (Canoy AS, Bourot S et De Rose R., BAYER). La première série d'analyses de transcriptome correspond à une première série d'expériences que j'appellerai « **expérience Agilent** ». Dans cette analyse trois types de comparaisons ont été effectuées. Les deux premières analyses de transcriptome comparent l'expression des gènes 24h et 48h après inoculation par une souche de *M. oryzae* avirulente sur la variété IR64 (porteuse de *Pi33*) avec l'expression des mêmes gènes chez un témoin non inoculé. La troisième analyse de transcriptome, compare l'expression des gènes 48h après inoculation, par une souche de *M. oryzae* virulente sur la variété IR64, avec l'expression des gènes chez un témoin non inoculé. Ces analyses ont permis d'établir un premier jeu de données comportant divers gènes différentiellement exprimés au cours de l'infection en condition incompatible et en condition compatible. A partir de ce jeu de données, il est possible de mettre en évidence certains gènes dont l'expression est vraisemblablement spécifique de l'interaction incompatible.

Afin de compléter ces données, une deuxième série d'analyses de transcriptome que j'appellerai « **expérience B8** » a été mise en place. Cette analyse compare l'expression des gènes 24h après inoculation, par la souche de *M. oryzae* IN81 avirulente sur la variété C101LAC (possédant *Pi33*), avec l'expression des gènes 24h après inoculation par la même souche de *M. oryzae* (IN81) virulente sur la variété C104LAC (ne possédant pas *Pi33*). Elle permet donc de mesurer un différentiel d'expression entre une condition incompatible et une condition compatible (et non pas comme la première série de puce l'expression des gènes par rapport à un témoin non inoculé). Cette série d'analyses de transcriptome doit donc permettre de mettre en évidence uniquement des gènes spécifiques des interactions incompatibles et plus particulièrement spécifiques de l'interaction *ACE1/Pi33*.

Après analyse des données d'hybridation sur puces, 57 gènes induits et 42 gènes réprimés ont été mis en évidence dans l'expérience « **Agilent** » (Vergne *et al.*, 2007) et 10 gènes sur-exprimés et 37 gènes sous-exprimés ont été mis en évidence dans l'expérience « **B8** » (Tableau 4.4), soit 146 gènes au total (Tableau 4.3). Peu de gènes ont été mis en évidence dans l'expérience « B8 », du fait d'un bruit de fond très important. En effet, de mauvaises conditions d'hybridation et de lavage peuvent entraîner un bruit de fond d'une intensité similaire à celle d'un gène faiblement exprimé (Meyers *et al.*, 2004). Dans ce cas, peu de gènes sont considérés comme

N° TIGR	Données d'hybridation	Lignée T-DNA disponible	Annotation TIGR	Gène exprimé dans l'expérience "Agilent"	Gène décrit dans la littérature	Sélection	Efficacité	Spécificité	Validation
Os02g48210	RC+	T-DNA	Protéine kinase	oui	oui	testé	error	Nd	Nd
Os06g09260	RC- RP2+		Protéine hypothétique			testé	error	Nd	Nd
Os12g30580	RC-		Protéine hypothétique			testé	error	Nd	Nd
Os12g36850	RA+ RC-		Protéine PR	oui	oui	testé	error	Nd	Nd
Os06g21110	RC-		Protéine hypothétique			testé	108	Non	Nd
Os08g31860	RC-	T-DNA	Protéine hypothétique		oui	testé	106.6	Non	Nd
Os09g23550	RC-		Sinapyl alcohol dehydrogénase	oui		testé	93.9	Non	Nd
Os02g10600	RC- RP2+		Protéine à domaine F-box (interaction)	oui		testé	95	Oui	Non
Os05g06500	RC-	T-DNA	Protéine de stress (USP)			testé	101.7	Oui	Non
Os05g15770	RA+ RC-		Inhibiteur de xylanase	oui		testé	94.2	Oui	Non
Os06g09560	RC-		Protéine à domaine DnaJ			testé	102.1	Oui	Non
Os08g42210	RC+		Transporteur de cation			testé	93.2	Oui	Non
Os11g02369	RA+ RC-		Transporteur de lipide		oui	testé	89.6	Oui	Non
Os12g19394	RA+ RC-		Ribulose bisphosphate carboxylase			testé	90.5	Oui	Non
Os01g62890	RC+		Protéine PRA1			testé	95.6	Oui	Oui
Os02g42450	RC+		Protéine hypothétique			testé	108	Oui	Oui
Os04g01330	RC-		Protéine hypothétique			testé	100.2	Oui	Oui
Os04g08630	RC+		Protéine hypothétique			testé	106.7	Oui	Oui
Os07g01960	RC-		Protéine hypothétique			testé	94.9	Oui	Oui
Os10g14870	RC+		Protéine heavy metal-associated			testé	103.7	Oui	Oui
Os11g40674	RC-		Protéine hypothétique			testé	112.7	Oui	Oui
Os01g03310	RC+		Protéine Bowman-Birk		oui				
Os02g13440	RC-		Protéine hypothétique						
Os03g42130	RC-		Oxidoreductase						
Os03g56450	RC-		Protéine hypothétique						
Os05g20870	RC+		Rétrotransposon						
Os06g14290	RC-		Rétrotransposon						
Os07g02260	RC-		Protéine hypothétique						
Os07g29390	RC+		Rétrotransposon						
Os07g39260	RC-		Protéine hypothétique						
Os08g16910	RC-		Cinnamyl alcohol dehydrogenase						
Os08g19480	RC+	T-DNA	Rétrotransposon						
Os08g26220	RC-		Protéine hypothétique	oui					
Os08g42850	RC-		Rétrotransposon						
Os09g23540	RC-		sinapyl alcohol dehydrogenase	oui					
Os11g29274	RC-		Protéine hypothétique						
Os11g33050	RC-		Protéine hypothétique						
Os11g35300	RC-		Glucosyltransferase						
Os11g41680	RC-		Cytochrome P450						
Os11g43900	RC-		Protéine hypothétique	oui	oui				
Os12g36880	RA+ RC-		PBZ1 Probenazole-induced		oui				
Os12g36900	RC-		Protéine hypothétique						
Nd	RC-		nd						
Nd	RC-		nd						
Nd	RC-		nd						
Nd	RC-		nd						
Nd	RC-		nd						

Tableau 4.4 : Bilan des 47 gènes différentiellement exprimés dans l'expérience « B8 » et sélection des 21 gènes dont le profil d'expression doit être validé en QPCR.

La colonne « Données d'hybridation » fait la synthèse de l'expression du gène dans différentes analyses de transcription. RC = Résistance Complète (= Puce C101LAC/C104LAC), RA et RP = Résistance Adulte ou Résistance Partielle (= hybridation de puce avec des ARN issus d'une interaction compatible sur le génotype Nipponbare). + = sur-expression et - = sous-expression.

Les gènes Os01g03310 et Os12g36880 n'ont pas été sélectionnés car ils étaient déjà décrits dans la littérature comme étant impliqués dans les réactions de défense (Kim *et al.*, 2004) .

Les gènes déjà mis en évidence dans l'expérience « Agilent » et dans la littérature sont signalés par un « oui ». La comparaison entre les différents jeux de données a été faite grâce à l'outil « All for One » de la base de données OrygenesDB.

Les trois dernières colonnes font le bilan des gènes dont l'expression a été validée par QPCR. Erreur = efficacité du couple d'amorces inférieure à 80 ou supérieure à 120.

exprimés de manière significative. Les gènes mis en évidence par cette analyse présentent des fonctions très variables dont certaines sont connues pour être impliquées dans les réactions de défense (Figure 4.4). Huit gènes sont communs aux deux analyses « Agilent » et « B8 » (soit 11% des gènes identifiés) et 7 gènes issus de l'expérience « B8 » sont déjà décrits dans la littérature comme étant différentiellement exprimés (soit 7% des gènes identifiés) (Tableau 4.4).

La technologie des puces à ADN pouvant engendrer différentes erreurs, les gènes issus des analyses de puces ont ensuite été testés par RT-PCR Quantitative, technique considérée comme plus fiable. Ce travail a été effectué en collaboration avec une doctorante, Emilie Vergne, et une stagiaire de Master Professionnel II, Sabrina Marques.

b Validation du jeu de données par RT-PCR Quantitative (QPCR)

Pour des raisons expérimentales, il n'était pas possible de tester la totalité des 146 gènes issus des analyses de transcriptome en QPCR. Nous avons donc sélectionné une partie de ces gènes pour valider leur expression par la QPCR. La validation comprend une validation technique qui consiste à confirmer les données issues des analyses de transcriptome en utilisant les ARN provenant de cette analyse, mais également une validation biologique sur des ARN obtenus dans des répétitions des mêmes interactions (Tableau 4.3). Parmi les 57 gènes induits dans les expériences « Agilent », 24 gènes ont ainsi été sélectionnés et l'expression de 13 de ces gènes a été validée (Vergne *et al.*, 2007).

Parmi les 47 gènes issus de l'expérience « B8 », 21 gènes ont été sélectionnés (Tableau 4.4). Six gènes sur-exprimés et 15 gènes sous-exprimés ont été sélectionnés sur différents critères : disponibilité d'une lignée T-DNA qui permettra de déterminer si la mutation de ce gène entraîne un phénotype plus sensible, expression du même gène dans d'autres conditions expérimentales (interactions compatibles), ou fonction prédite (Tableau 4.4). La mauvaise qualité des données issues de l'expérience « B8 » est confirmée par le fait que le gène *PBZ1* a un profil d'expression inattendu. Il est sous-exprimé, alors que dans les données issues de la littérature et les données disponibles au laboratoire, il est plus fortement induit en condition incompatible (Midoh et Iwata, 1996 ; Kim *et al.*, 2004). L'expression de seulement sept des 21 gènes a été validée par RT-PCR quantitative. Ce faible taux de validation s'explique de deux manières. Une première raison est technique. Malgré plusieurs tentatives de définition d'amorces, les amorces définies pour amplifier sept des gènes étaient soit non spécifiques, soit peu efficaces pour permettre une amplification robuste. La deuxième raison est que l'expression de sept des gènes n'était pas répétable. Aucun des gènes déjà décrits n'a été validé dans nos conditions. Le taux de gènes issus de l'expérience « B8 » dont le profil d'expression est validé est donc de 33% contre

54% pour l'expérience « Agilent ». Parmi ces gènes, deux (Os02g42450 et Os11g40674) présentaient une expression différentielle opposée à celle décrite par les puces. Cependant, ils ont été conservés car les résultats obtenus en PCR quantitative étaient répétables.

Au total, nous avons donc conservé 34 gènes pour des mesures d'expression dans différentes interactions (Tableau 4.3).

c Comparaison de l'expression de gènes de défense dans le cadre de différentes interactions

Le jeu de gènes que nous avons ainsi mis en place a été utilisé pour comparer leur expression dans différentes conditions dont certaines correspondent aux conditions expérimentales qui ont permis de les choisir. L'objectif était de mettre en évidence des gènes dont l'expression serait spécifique de la résistance et de vérifier leur spécificité. Nous avons donc comparé l'expression des gènes à différents temps (24h après inoculation et 48h après inoculation) et dans différentes conditions compatibles et incompatibles. Quatre types de comparaisons ont ainsi été effectuées :

- entre l'interaction incompatible entre IR64 et l'isolat PH14 transformé avec *ACE1* (AVR*Pi33*) et un témoin non inoculé : **IR64-PH14(*ACE1*)/IR64-Gélatine (Incompatible/Gélatine).**
- entre l'interaction compatible entre IR64 et l'isolat PH14 sauvage (VIR*Pi33*) et un témoin non inoculé : **IR64-PH14/IR64-Gélatine (Compatible/Gélatine).**
- entre l'interaction incompatible entre Nipponbare et l'isolat CL26 et un témoin non inoculé : **Nipponbare-CL26/Nipponbare-Gélatine (Incompatible/Gélatine).**
- entre l'interaction incompatible entre C101LAC et l'isolat IN81 et l'interaction compatible entre C104LAC et l'isolat IN81 : **C101LAC-IN81/C104LAC-IN81 (Incompatible/Compatible).**

c.1 Comparaison des expressions entre les conditions compatibles et incompatibles

Pour mettre en évidence des gènes spécifiques de la résistance, une comparaison entre l'expression en condition incompatible et l'expression en condition compatible est nécessaire. D'après la littérature, les gènes impliqués dans le cadre de la réaction incompatible, le sont également lors d'une réaction compatible mais avec des différences de cinétique ou d'intensité (Tao *et al.*, 2003 ; Vergne *et al.*, 2007 ; Ribot *et al.*, 2007).

D'après les données d'analyse de transcriptome de l'expérience « Agilent », sur les 57 gènes induits au cours de l'infection, 21 (soit 37%) sont induits dans les deux conditions incompatible et compatible (Vergne *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus par QPCR sur l'ensemble des 34 gènes sélectionnés. En effet, 20 gènes (soit 69%) sont induits à la

	Genes	Type	Origine	IR64-PH14(*ACE1*) Incompatible/Gélatine 24h	IR64-PH14(*ACE1*) Incompatible/Gélatine 48h	IR64-PH14 Compatible/Gélatine 24h	IR64-PH14 Compatible/Gélatine 48h	Nipponbare-CL26 Incompatible/Gélatine 24h	Nipponbare-CL26 Incompatible/Gélatine 48h	C101LAC-IN81/ C104LAC-IN81 Inc/Comp 24h	{IR64-PH14(*ACE1*)/Gélatine}/ Inc/Comp 24h	{IR64-PH14(*ACE1*)/Gélatine}/ Inc/Comp 48h
A	Os02g02980	EDS5	Littérature	+	+	0	0	0	0	++	+	+
	Os01g69080	SSI2	Littérature	--	+	0	0	0	-	0	--	+
	Os05g02070	OsMT2b	Littérature	-	+	0	0	0	-	0	-	+
	Os01g43540	OsSGT1	Littérature	0	+	0	0	0	-	0	0	+
	Os12g38210	OsSPL11	Littérature	0	+	0	0	0	-	0	0	+
	Os05g45410	OsSPL7	Littérature	+	--	0	0	0	+	0	+	--
	Os01g63420	COI1	Littérature	++	+	0	-	0	-	0	++	++
	Os04g08630	Protéine hypothétique	Expérience B8	++	Nd	0	-	+++	--	+++	++	Nd
B	Os07g18750	DIR1	Littérature	-	+	+	0	+	--	0	--	++
	Os03g06410	OsEDR1	Littérature	0	+	+	0	+	-	0	-	+
	Os01g57770	SABP2	Littérature	0	+	+	0	+	+	0	-	+
	Os01g62890	Protéine PRA1	Expérience B8	+	Nd	+	0	++	-	++	0	Nd
	Os04g24220	Kinase	Expérience Agilent	+	++	++	0	-	+	0	--	++
	Os09g09830	Protéine à domaine Heavy metal-associated	Expérience Agilent	+	+	++	0	+	0	0	--	++
	Os10g40930	Oxidoreductase	Expérience Agilent	+	++	+	0	0	+	0	0	+
	Os01g64110	Chitinase	Expérience Agilent	+	+	++	0	0	+	0	-	+
	Os06g50300	Hsp90	Expérience Agilent	+	+	+	0	0	0	0	-	+
	Os02g08440	WRKY09	Expérience Agilent	+	++	+	0	0	0	0	0	++
	Os08g10310	LRR-kinase	Expérience Agilent	++	++	++	0	0	0	0	+	++
	Os08g06280	OsLSD1	Littérature	--	-	+	-	+	-	0	--	0
	Os10g42430	JIN	Littérature	+	0	++	-	0	0	0	-	+
	Os03g16950	Protéine sécrétée 33kDa	Expérience Agilent	+	+	++	-	0	++	+	-	++
C	Os01g03940	OsNRR	Littérature	+	+	--	+	0	+	0	++	-
	Os05g49140	OsMAPK6	Littérature	--	+	+	+	0	0	0	--	+
	Os07g48020	Peroxidase	Expérience Agilent	++	++	+	+	-	++	0	+	++
	Os01g58290	Subtilase	Expérience Agilent	+	++	+	++	0	+	-	0	+
	Os06g03580	Portéine de type doigt de Zinc	Expérience Agilent	+	++	++	+	0	+	0	--	+
	Os11g39370	LRR-kinase	Expérience Agilent	+	+	++	+	0	+	++	--	+
	Os07g35560	Chitinase	Expérience Agilent	++	++	++	++	0	++	--	--	++
D	Os04g01330	Protéine hypothétique	Expérience B8	++	Nd	Nd	Nd	0	0	---	Nd	Nd
	Os07g01960	Protéine hypothétique	Expérience B8	0	Nd	Nd	Nd	+++	---	---	Nd	Nd
	Os11g40674	Protéine hypothétique	Expérience B8	Nd	Nd	Nd	Nd	0	Nd	++	Nd	Nd
	Os02g42450	Protéine hypothétique	Expérience B8	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd
	Os10g14870	Protéine à domaine Heavy metal-associated	Expérience B8	0	Nd	Nd	Nd	+	--	++	Nd	Nd

Tableau 4.5. Profil d'expression des 34 gènes sélectionnés.

Adapté de Vergne *et al*. (2007). L'expression des gènes est quantifiée par RT-PCR Quantitative. A = gènes non induits en condition compatible, éventuellement spécifiques de la résistance. B = gènes induits à 24h en condition compatible et non induits à 48h, marqueurs potentiels de la résistance à 48h. C = gènes induits en condition compatible et non induit à 24h chez Nipponbare-CL26. D = gènes pour lesquels les données sont partielles.

Les différentes conditions correspondent aux conditions expérimentales qui ont permis l'hybridation des puces à ADN. Les six premières colonnes sont une mesure d'expression en condition inoculée par rapport à un témoin non inoculé. Les trois dernières colonnes sont issues d'un rapport entre une expression en condition incompatible et une expression en condition compatible.

++ = induction plus de trois fois supérieure au témoin, + = induction de 1,5 à 3 fois supérieure au témoin, - = répression de 1,5 fois à 3 fois supérieure au témoin, -- = répression plus de trois fois supérieure au témoin, 0 = gène non différentiellement exprimé.

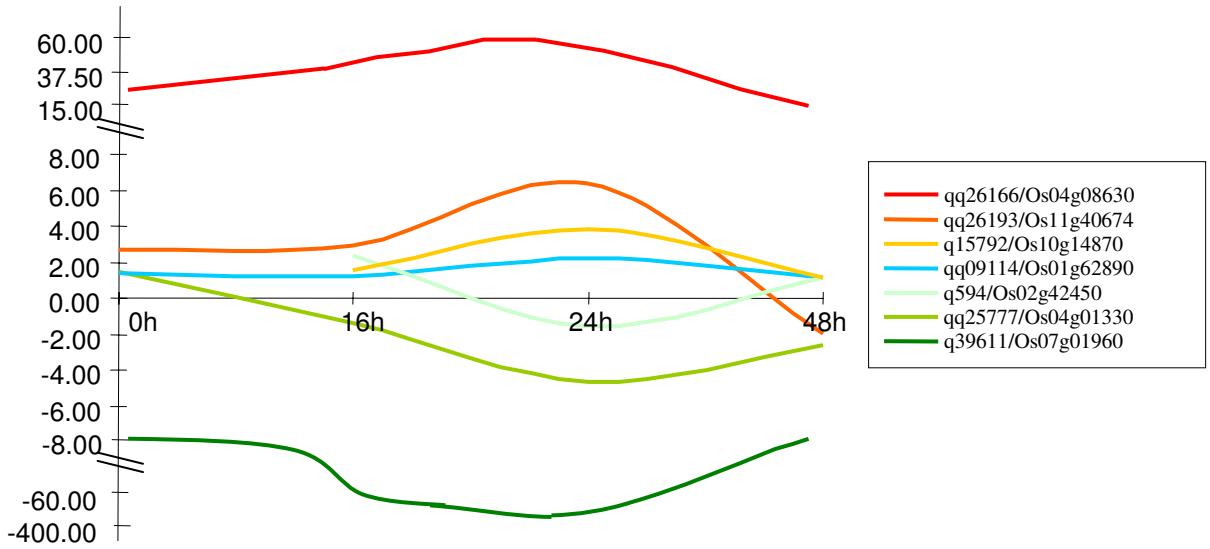


Figure 4.5. Cinétique d'expression pour les sept gènes issus de l'expérience « B8 ».

Le différentiel d'expression entre la condition incompatible C101LAC/IN81 et la condition compatible C104LAC/IN81 est mesuré à différents temps avant et après inoculation. Les données à 0h ne sont pas disponibles pour les gènes q15792 et q594 du fait d'erreurs techniques.

fois dans des interactions compatibles et incompatibles, quel que soit le temps considéré (Tableau 4.5). Pour cet échantillon de gènes, la différence entre les deux conditions compatible et incompatible, résiderait dans l'intensité de l'expression à 48h, plutôt que dans la cinétique d'expression. En effet, à partir de ces données, il est possible de faire un rapport entre l'expression en condition incompatible et l'expression en condition compatible dans le cadre de deux types d'interaction *ACE1/Pi33* (IR64-PH14(*ACE1*)/IR64-PH14 et C101LAC-IN81/C104LAC-IN81) (Tableau 4.5). Cette méthode de calcul indique qu'à 48h, 89% des gènes sont sur-exprimés en condition incompatible.

Les données de l'expérience « B8 » permettent également de mettre en évidence une différence de cinétique entre les deux conditions incompatible et compatible. L'expression des sept gènes issus de l'expérience « B8 » qui présentaient un différentiel d'expression validé en QPCR, a été mesurée à différents temps avant et après inoculation (0h, 16h, 24h et 48h) (Figure 4.5). A 24h, un pic d'expression différentielle est observé en condition incompatible alors qu'à 48h, la différence d'expression entre les deux conditions incompatible (C101LAC-IN81) et compatible (C104LAC-IN81) est plus réduite voire nulle. La reconnaissance du gène d'avirulence par le gène de résistance permettrait d'induire ou de réprimer ces sept gènes plus précocement lors de l'interaction incompatible par rapport à la condition compatible.

D'autre part, cette expérience permet de mettre en évidence une influence du fond génétique sur l'expression de ces gènes. En effet, avant l'inoculation (à 0h) deux des gènes présentent un différentiel d'expression élevé entre C101LAC et C104LAC bien que ces lignées soient isogéniques. L'expression constitutive de ces gènes varierait donc en fonction du fond génétique. Deux hypothèses peuvent alors être envisagées : soit cette différence est due à la présence de *Pi33* (même en l'absence d'inoculation), soit cette différence est due au fait qu'aux loci des gènes considérés, les lignées ne sont pas isogéniques.

Pour conclure, sur les 34 gènes sélectionnés pour notre analyse, seulement 8 gènes ne sont pas induits en condition compatible quel que soit le temps considéré et pourraient donc être de bons marqueurs de la résistance (échantillon A dans le Tableau 4.5). Quatorze gènes ne sont pas induits à 48h en condition compatible et pourraient être de bons marqueurs de la résistance à 48h (échantillon B dans le Tableau 4.5). Seulement deux gènes sont surexprimés dans les deux comparaisons incompatible/compatible : EDS5 (Nawrath *et al.*, 2002), qui code pour un transporteur de type MATE (Multidrug And Toxin Extrusion) et une protéine hypothétique Os04g08630. Ces gènes pourraient être de bons marqueurs de l'interaction *ACE1/Pi33*.

c.2 Comparaison des expressions entre plusieurs conditions incompatibles

Nous souhaitions dans un premier temps, confirmer que l'expression de certains des gènes mis en évidence ci-dessus (échantillon A et B dans le Tableau 4.5) serait spécifique de la résistance en comparant les trois conditions incompatibles déjà à notre disposition. Puis dans un second temps, nous avons sélectionné parmi ces gènes, sept gènes comme marqueurs pour comparer les profils d'expression à différents temps après inoculation de trois nouvelles interactions incompatibles.

c.2.1 Expériences préliminaires

Afin de confirmer que l'expression de certains des gènes est spécifique de la résistance (échantillons A et B dans le Tableau 4.5), l'expression des 34 gènes a été mesurée dans le cadre d'une autre interaction incompatible faisant intervenir le génotype Nipponbare et l'isolat CL26. Dix-sept gènes (soit 59%) sont induits dans les deux conditions incompatibles (IR64/PH14-*ACE1* et Nipponbare/CL26). Cependant, sur ces 17 gènes, 11 semblent être induits plus tôt dans l'interaction IR64/PH14-*ACE1*. Deux hypothèses permettent d'expliquer cette différence :

- soit la présence de *Pi33* stimulerait une réponse des réactions de défense plus tôt
- soit la différence du fond génétique entre un indica (IR64) et un japonica (Nipponbare) est suffisante pour entraîner des différences de transcriptome.

Cette analyse met en évidence six gènes (soit 22%) qui sont différentiellement exprimés à 48h dans les deux conditions incompatibles mais non exprimés en condition compatible (*OsSPL7, SABP2,* Os04g24220, Os10g40930, Os03g16950 et Os01g64110). Seul le gène Os04g08630 (codant pour une protéine hypothétique) est également sur-exprimé à 24h chez C101LAC-IN81. La majorité des gènes est donc spécifique d'une interaction incompatible en particulier. Ainsi, 14 gènes (soit 48%) sont induits à 24h ou à 48h dans une seule condition incompatible et non exprimés en condition compatible. Par exemple, les gènes COI1, SGT1 et SPL11 semblent spécifiques de l'interaction IR64/PH14-*ACE1* puisqu'ils ne sont induits que dans cette interaction. Le gène *EDS5* serait le seul gène qui semble spécifique de l'interaction *Pi33* puisqu'il n'est pas induit dans l'interaction Nipponbare/CL26 mais est différentiellement exprimé dans les deux interactions incompatibles impliquant le gène *Pi33*.

c.2.2 Contraintes expérimentales

Pour des raisons pratiques expérimentales, il n'était pas possible de tester tous les gènes identifiés comme marqueurs de la résistance ou comme spécifiques d'une interaction en particulier. A partir du jeu de gènes mis en évidence au paragraphe précédent, sept gènes ont donc été sélectionnés pour être testés dans de nouvelles interactions incompatibles (Tableau 4.6).

N° Tigr	Amorce	Annotation	Provenance	Choix
Os04g24220	q4963	Protéine kinase	« Agilent »	Marqueur de la résistance
Os12g35880	qPBZ1	ProBenaZol induced	Littérature	Marqueur de la résistance
Os01g43540	qSGT1	Suppressor of the G2 allele of skp1	Littérature	Spécifique IR64/PH14-ACE1
Os01g63420	qCOI1	Coronatine Insensitive 1	Littérature	Spécifique IR64/PH14-ACE1
Os12g38210	qSPL11	SPotted Leaf11	Littérature	Spécifique IR64/PH14-ACE1
Os01g62890	qq09114	Protéine PRA1	« B8 »	Spécifique C101LAC/IN81
Os02g02980	qEDS5	Enhanced Disease Susceptibility 5	Littérature	Spécifique de Pi33

Tableau 4.6. Sélection de sept gènes pour une comparaison des profils d'expression dans différentes conditions incompatibles.

Les critères de choix de ces gènes est décrit dans la dernière colonne.

Les gènes Os04g24220, qui code pour une protéine kinase, et *PBZ1* (Os12g35880) ont été sélectionnés car ils font partie des gènes marqueurs de la résistance à 48h. Les gènes SGT1 (Os01g43540), SPL11 (Os12g38210) et COI1 (Os01g63420) ont été sélectionnés car ils semblent spécifiques de l'interaction IR64/PH14-*ACE1* à 24h. De plus, se sont tous les trois des gènes décrits dans la littérature comme étant des régulateurs des voies de défense. Le gène EDS5 (Os02g02980) a été sélectionné car il pourrait être, au vu des premiers résultats, un bon marqueur de la résistance spécifique impliquant *Pi33*. Enfin, le gène Os01g62890, qui code pour une protéine similaire aux protéines Prenylated Rab Acceptor (PRA1) des mammifères, a été sélectionné car il pourrait être spécifique de l'interaction C101LAC/IN81.

Il nous a paru nécessaire de tester les deux hypothèses énoncées plus haut pour expliquer des différences d'expression entre interactions incompatibles : soit l'expression dépend du gène de résistance, soit elle dépend du fond génétique (indica et japonica). Pour tester ces hypothèses nous avons comparé l'expression de gènes sur des cinétiques (16h, 24h et 48h) après inoculation dans plusieurs interactions incompatibles faisant intervenir des gènes de résistance et d'avirulence différents :

- **C101LAC** (porteur de ***Pi33*** et de *Pi1*) / **BG1** (porteuse de ***ACE1*** donc avirulente vis-à-vis de *Pi33* et virulente vis-à-vis de *Pi1*),
- **C104LAC** (porteur de ***Pi1***) / **CD69** (avirulente vis-à-vis de *Pi1*)
- **Nipponbare** (gène de résistance non identifié) / **CL3.6.7** (avirulente vis-à-vis de Nipponbare).

L'expression des gènes a été mesurée à trois temps différents (16h, 24h et 48h). Pour chaque interaction une comparaison est faite par rapport à un témoin non inoculé (Tableau 4.7). Ces comparaisons font intervenir des fonds génétiques similaires possédant des gènes de résistance différents (C101LAC-*Pi33*/C104LAC-*Pi1* et Nipponbare-CL26/Nipponbare-CL3.6.7) et inversement des fonds génétiques différents faisant intervenir des gènes de résistance similaires (IR64-*Pi33*/C101LAC-*Pi33*).

Cependant, pour des raisons expérimentales, des souches différentes de *M. oryzae* ont dues être utilisées. Afin de vérifier l'hypothèse que les différences observées pourraient être dues à des différences d'agressivité des souches de *M. oryzae*, l'expression de cinq gènes pris parmi notre échantillon de gènes a été mesurée lors de deux inoculations faisant intervenir des souches isogéniques de *M. oryzae*. Si des différences d'expression sont observées lors d'inoculations faisant intervenir deux souches isogéniques, à fortiori des différences d'expression seront attendues

q4751-2/Os07g35560	q5864/Os01g58290	q3394/Os11g39370	qq09114/Os01g62890	qq26166/Os04g08630
Chitinase	Subtilase	LRR-kinase	Protéine PRA1	Protéine hypothétique
--	--	0	0	0

Tableau 4.8. Influence de l'inoculum sur l'expression de gènes de défense.

Données d'expression d'une sélection de cinq gènes. Un rapport est fait entre deux conditions compatibles et permet de comparer l'effet de la souche transformée CM28-Ace1 par rapport à la souche sauvage CM28 sur le génotype japonica Azucena (Azucena-CM28(*ACE1*)/Azucena-CM28). Les ARN ont été prélevés 24h après inoculation. -- = répression plus de trois fois supérieure au témoin, 0 = gène non différentiellement exprimé.

Azucena-CM28(*ACE1*)

Azucena-CM28

		q4963/Os04g24220			qq9114/Os01g62890		
		16h	24h	48h	16h	24h	48h
IR64/PH14-ACE1	*Pi33/ACE1*	Nd	+	++	Nd	+	Nd
C101Lac/BG1	*Pi33/ACE1*	++	+	++	++	0	++
C104Lac/CD69	*Pi1/AVRPi1*	-	--	++	-	--	++
Nipponbare/CL3.6.7	R/AVR inconnu	0	0	0	0	0	0
Nipponbare/CL26	R/AVR inconnu ?	Nd	-	+	Nd	+	0
IR64/PH14	Compatible	Nd	++	0	Nd	+	0

		OsSGT1/Os01g43540			COI1/Os01g63420			OsSPL11/Os12g38210		
		16h	24h	48h	16h	24h	48h	16h	24h	48h
IR64/PH14-ACE1	*Pi33/ACE1*	Nd	0	+	Nd	++	+	Nd	0	+
C101Lac/BG1	*Pi33/ACE1*	++	+	++	+	-	++	++	0	++
C104Lac/CD69	*Pi1/AVRPi1*	-	-	++	-	--	++	--	--	++
Nipponbare/CL3.6.7	R/AVR inconnu	++	-	-	++	+	-	++	--	0
Nipponbare/CL26	R/AVR inconnu ?	Nd	0	-	Nd	0	-	Nd	0	-
IR64/PH14	Compatible	Nd	0	0	Nd	0	-	Nd	0	0

		EDS5/Os02g02980			PBZ1-2/Os12g35880		
		16h	24h	48h	16h	24h	48h
IR64/PH14-ACE1	*Pi33/ACE1*	Nd	+	+	Nd	0	+
C101Lac/BG1	*Pi33/ACE1*	0	+	+	++	++	++
C104Lac/CD69	*Pi1/AVRPi1*	0	-	++	-	0	++
Nipponbare/CL3.6.7	R/AVR inconnu	+	--	0	++	-	++
Nipponbare/CL26	R/AVR inconnu ?	Nd	0	0	Nd	Nd	Nd
IR64/PH14	Compatible	Nd	0	0	Nd	0	0

Tableau 4.7. Profil d'expression de sept gènes lors de différentes interactions incompatibles.

Les conditions sont rappelées à gauche (génotype/souche). Le couple gène R/gène Avr intervenant dans l'interaction est également précisé dans la deuxième colonne. L'expression a été mesurée en comparaison à un témoin non inoculé à trois temps (16h, 24h et 48h) sur trois répétitions. ++ = induction plus de trois fois supérieure au témoin, + = induction de 1,5 à 3 fois supérieure au témoin, - = répression de 1,5 fois à 3 fois supérieure au témoin, -- = répression plus de trois fois supérieure au témoin, 0 = gène ni induit ni réprimé. L'origine des sept gènes est décrite dans le tableau 4.6.

lorsque deux souches plus différentes seront utilisées. Les différences d'expression observées peuvent également être dues à des effets de l'environnement ou à de légères différences dans la quantité d'inoculum. Nous partirons du principe que ces variations expérimentales sont similaires entre les expériences. L'expression des cinq gènes est comparée lors d'inoculations faisant intervenir le génotype Azucena. Il s'agit dans les deux inoculations comparées d'une interaction compatible. Sur les cinq gènes considérés, deux gènes présentaient une expression différentielle entre ces deux conditions (Tableau 4.8). L'hypothèse selon laquelle l'isolat ou plus généralement l'inoculum utilisé dans le cadre d'une interaction peut expliquer des différences d'expression pour certains gènes ne peut être rejetée. Cependant, ne pouvant procéder autrement pour notre expérimentation, nous avons choisi de continuer notre comparaison des profils d'expression en condition incompatible en tenant compte de cette limite de notre expérience.

c.2.3 Influence du gène de résistance et du fond génétique sur l'expression des gènes de défense.

Seul le gène *PBZ1* est confirmé comme étant un bon marqueur de la résistance car il est induit (par rapport au témoin non inoculé) dans les trois conditions à 48h (Tableau 4.7). Ce gène est d'ailleurs considéré dans la littérature comme un marqueur classique des réactions de défense (Midoh et Iwata, 1996 ; Kim *et al.*, 2004). Le gène *EDS5* est confirmé comme étant spécifique de *Pi33* mais uniquement à 24h. En effet, à 48h il apparaît comme étant également induit chez C104LAC (Tableau 4.7). Les gènes OsSGT1, OsSPL11 et COI1 qui semblaient spécifiques de l'interaction IR64/PH14-*ACE1*, s'avèrent être non spécifiques de cette interaction. Par contre, ils semblent présenter une spécificité envers les génotypes indica, notamment à 48h. Les cinétiques d'expression de ces gènes sont très variables entre les interactions. Cependant, la comparaison des profils d'expression entre les interactions peut permettre de faire ressortir certaines tendances.

Pour chaque temps l'expression dans deux interactions est considérée comme similaire si elle présente le même type d'expression différentielle (induit, réprimé ou même niveau d'expression que le témoin). Une similarité entre interactions peut ainsi être calculée à partir des profils d'expression des gènes (Tableau 4.9). Pour visualiser ces similarités, un arbre a été construit avec le logiciel DARWIN (Figure 4.6). L'analyse de cet arbre permet de faire ressortir trois principaux groupes : un groupe qui rassemble les interactions indica, un groupe qui rassemble les deux interactions IR64-PH14 et Nipponbare-CL26 et une branche à part pour l'interaction Nipponbare-CL3.6.7. Bien que des phénotypes de type HR aient été observés dans l'interaction Nipponbare-CL26, quelques lésions intermédiaires sont également observées (Figure 4.7). Cette interaction pourrait correspondre plutôt à un très fort niveau de résistance basale

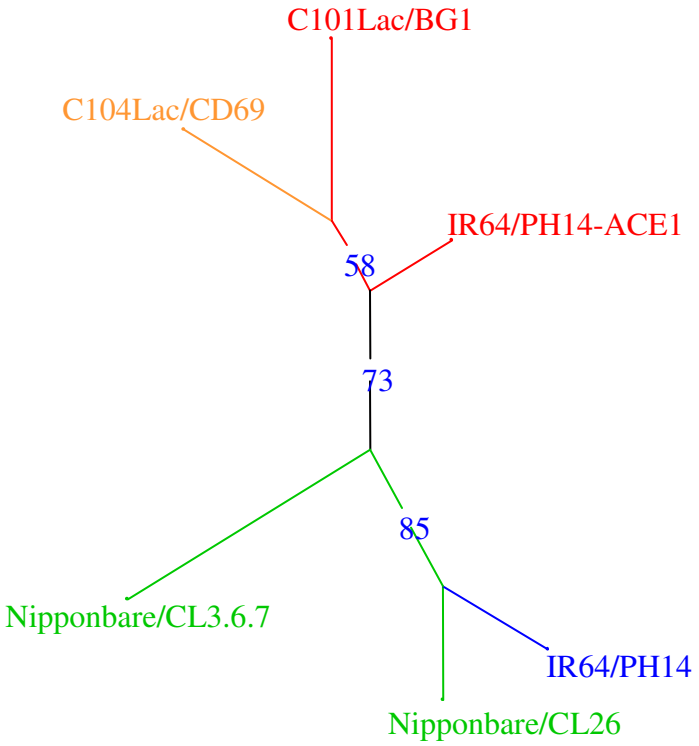


Figure 4.6. Arbre des cinétiques d'expression.

L'arbre a été construit par Neighbor joining avec le logiciel DARWIN à partir de l'indice de Sokal et Michener. En vert les interactions impliquant les japonica. En bleu l'interaction compatible, en rouge les interactions incompatibles faisant intervenir le gène *Pi33* et en orange l'interaction faisant intervenir le gène *Pi1*. Pour limiter l'influence des données manquantes seuls les points à 24h et 48h ont été considérés.

			Points communs		Points communs à 48h	
IR64/PH14-ACE1	IR64/PH14	Incompatible vs Compatible	2/13	15%	0/6	0%***
IR64/PH14-ACE1	C101Lac/BG1	Génotype différents	8/13	62%***	6/6	100%***
Nipponbare/CL26	Nipponbare/CL3.6.7	Gènes différents	3/12	25%	3/6	50%***
C101Lac/BG1	C104Lac/CD69	Gènes différents	7/21	33%*	7/7	100%***
Moyenne		Génotype et gènes différents		22%		28%

Tableau 4.9. Pourcentage d'homologie entre les profils d'expression.

Pour chaque temps l'expression de deux interactions est considérée comme similaire si elle présente le même type d'expression différentielle (induit, réprimé ou nul). On calcule ensuite une fréquence d'homologie : nb de points similaires/nb total de points comparés. *** = fréquence significativement différente de la moyenne pour une p-value < 0,01 par un test de Chi2. * = p-value 0,06.

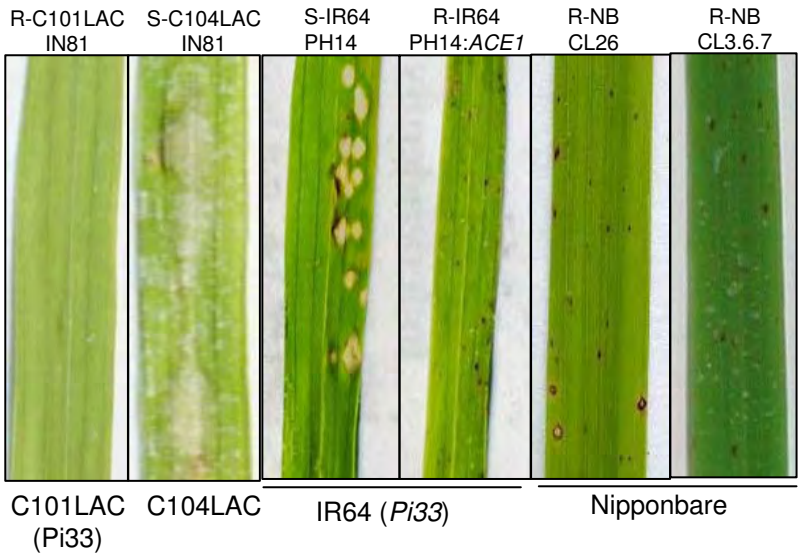


Figure 4.7. Symptômes obtenus sur les variétés utilisées.

plutôt qu'à une résistance spécifique de type gène-pour-gène. Dans cette hypothèse, il n'est donc pas surprenant qu'elle se regroupe avec l'interaction compatible IR64-PH14. La structure de l'arbre semble refléter la structure en deux sous-espèces indica et japonica pour ce qui concerne les interactions strictement incompatibles.

L'analyse des pourcentages d'homologie des profils d'expression sur les trois temps de la cinétique (Tableau 4.9) semble mettre en évidence l'influence du gène de résistance sur l'expression des gènes de défense. En effet, le pourcentage d'homologie entre les cinétiques d'expression des deux interactions faisant intervenir les génotypes isogéniques C101LAC et C104LAC (7 sur 21 points similaires soit 33,3%) est inférieur au pourcentage d'homologie existant entre les deux interactions *Pi33/ACE1* où 8 points similaires sur 13 sont répertoriés (soit 61,5% d'homologie). Ce résultat pourrait être l'indice que la présence d'un même gène de résistance (ici *Pi33*) a une influence plus importante qu'un fond génétique similaire sur la cinétique d'expression des gènes de défense sélectionnés. Cependant, l'impact de l'isolat utilisé pour l'inoculation ne peut pas être complètement écarter pour expliquer les différences importantes mesurées entre C101LAC et C104LAC.

D'autre part, le pourcentage d'homologie entre C101LAC-BG1 et C104LAC-CD69 (33,3%) (même fond génétique mais gène de résistance différent) reste supérieur aux résultats obtenus en comparant deux génotypes éloignés portant des gènes de résistance différents (21,6% en moyenne). Ce résultat implique que le fond génétique a également une influence non négligeable sur l'expression des gènes de défense.

IV.3.2 Discussion et conclusion

a <u>Originalité de la voie de défense contrôlée par *Pi33*</u>

Beaucoup des gènes que nous avons identifiés par les hybridations sur puces à ADN ont des fonctions qui sont connues pour être impliquées dans la réponse à des attaques par des agents pathogènes (par exemple : facteur de transcription de type WRKY, kinase membranaire, protéine hsp90, subtilase et autres protéases). De plus, la représentation des catégories de gènes obtenus (gènes de défense, transport, facteurs de transcription, …) est très similaire à celle obtenue dans d'autres études (Chu et *al.*, 2004 ; Lu *et al.*, 2004 ; Jantasuriyarat *et al.*, 2005) (Figure 4.4). Cela confirme la qualité de notre jeu de données. Seulement 7% des gènes mis en évidence sont déjà décrits dans la littérature pour avoir un rôle dans la réponse des plantes aux agents pathogènes et seulement 11% des 146 gènes sont identifiés dans les deux analyses de transcriptome. Ce résultat est cohérent avec le résultat décrit par Droc *et al.* (2006) : sur 923 gènes probablement impliqués dans la résistance seulement 18% ont été décrits comme étant différentiellement exprimés

pendant l'infection dans au moins deux publications indépendantes. Ce résultat justifie de faire des analyses de transcriptome complémentaires car tous les gènes n'ont pas encore été identifiés.

D'autre part, ces données confirment que **la majorité des gènes induits au cours de l'infection en situation incompatible le sont également, bien que plus tardivement, en condition compatible** (Vergne *et al.*, 2007). Ce résultat a déjà été décrit dans la littérature (Tao *et al.*, 2003 ; Ribot *et al.*, 2007). Aucun des gènes identifiés ne semble spécifique de l'interaction *ACE1/Pi33*. Peu d'exemples de gènes exprimés de manière spécifique à une interaction gène-pour-gène ont été décrits. Un composant du protéasome est décrit comme étant induit spécifiquement lors de l'interaction impliquant le gène *Pi1* (Wen *et al.*, 2003). **La spécificité des différentes interactions incompatibles résiderait plutôt dans la cinétique d'expression de ces gènes.** Par exemple, le gène EDS5 serait induit très précocement (à 16h) dans l'interaction Nipponbare/CL3.6.7 puis serait réprimé pour finalement avoir une expression équivalente au témoin non inoculé à 48h. Dans les deux interactions *ACE1/Pi33* étudiées, il serait induit de manière spécifique à 24h. A 48h, il est induit chez tous les indica.

Dans le cas des deux interactions impliquant le génotype Nipponbare, par contre, les deux voies de signalisation semblent être bien différentes et ne convergeraient pas à 48h. Cependant, bien que des phénotypes de type HR aient été observés dans l'interaction Nipponbare/CL26, cette interaction pourrait correspondre plutôt à un très fort niveau de résistance basale plutôt qu'à une résistance spécifique de type gène-pour-gène. En effet, Nipponbare est une variété à résistance partielle moyenne et lors d'inoculations avec la souche CL26 elle peut parfois présenter quelques lésions sensibles peu développées. Dans ce cas, les différences observées seraient dues au fait qu'une voie de signalisation en condition incompatible (Nipponbare/CL3.6.7) est comparée avec une voie de signalisation de résistance basale élevée en condition compatible (Nipponbare/CL26).

D'autre part, la présence d'un gène de résistance particulier pourrait également être un facteur important pour expliquer l'expression des gènes de défense. En effet, les génotypes C101LAC (*Pi1* + *Pi33*) et C104LAC (*Pi1*) sont isogéniques. Or, ils présentent des profils d'expression différents dans les temps précoces (16-24h) après infection mais comparables pour les temps tardifs (à 48h). Ce résultat pourrait indiquer que les deux gènes de résistance spécifiques (*Pi1* et *Pi33*) utilisent des voies de régulation différentes pour aboutir au final, à 48h, à des effets similaires sur le système de défense. Le principe de voies différentes de régulation qui présenteraient des points communs a également été décrit dans la comparaison des gènes induits par deux agents pathogènes différents : le champignon *M. oyzae* et la bactérie *X. oryzae* (Li *et al.*, 2006).

b Influence du fond génétique sur le système de défense

Bien qu'il ne faille pas négliger l'influence de l'inoculum sur nos résultats et notamment de l'agressivité des souches utilisées, l'influence du fond génétique indica ou japonica semble être un des facteurs principaux pour expliquer l'expression des gènes étudiés. En effet, six des gènes étudiés semblent être spécifiques du fond génétique indica à 48h et pourraient donc être de bons marqueurs de la résistance dans un fond indica. Si le fond génétique présente une influence significative sur l'expression des gènes de défense, cela peut avoir plusieurs conséquences. En sélection, cette interaction rend la sélection de variétés résistantes plus complexe. Par contre, elle ouvre des perspectives de création de nouvelles combinaisons qui pourraient être plus efficaces que les combinaisons « naturelles ». D'un point de vue évolutif, cela impliquerait que les voies de défense pourraient se spécialiser sur certains gènes clefs plus adaptés à un environnement donné. Il semble également capital d'évaluer les interactions entre gène de résistance et fond génétique. En effet, un gène de résistance ne sera peut-être pas toujours aussi efficace dans un nouveau fond génétique. Ainsi *xa5*, *Xa21* et *Xa26* seraient plus efficaces dans un fond génétique indica (Li *et al.*, 2001 ; Sun *et al.*, 2004). Ces différences peuvent être dues à des différences au niveau des promoteurs des gènes de résistance (*xa3* ; Cao *et al.*, 2007) mais elles pourraient également être liées à des différences au niveau des gènes de défense eux-mêmes. Ainsi, mieux caractériser l'influence du fond génétique devrait permettre de mieux comprendre la régulation du système de défense des plantes.

D'après cette analyse, la présence d'un gène de résistance commun aurait plus d'influence que le fond génétique sur l'expression des gènes de défense. En effet, 62% d'homologie a été mesurée entre les deux interactions faisant intervenir *Pi33* (IR64/PH14-*ACE1* et C101LAC/BG1). Les différences de profil d'expression entre ces deux génotypes pourraient s'expliquer par le fait qu'ils ne possèdent pas le même allèle de *Pi33* (voir Chapitre 1) ou bien du fait de leur différence de fond génétique.

Afin de mettre en évidence l'influence du fond génétique sur l'expression des gènes de défense, des mesures préliminaires d'expression de trois gènes ont été réalisées sur huit descendants SSD (porteurs de *Pi33*) d'un croisement entre une variété indica porteuse de *Pi33* (IR64) et une variété japonica sensible (Azucena) (données non présentées). Cette expérience devait nous permettre de comparer l'expression des gènes dans des fonds génétiques, dont nous connaissions l'origine parentale grâce à des données de marqueurs génétiques répartis sur l'ensemble du génome. C'est-à-dire que pour chaque descendant, il est possible de déterminer au niveau du génome ainsi qu'à chaque locus s'il présente plutôt le type d'un des parents (IR64, indica) ou de l'autre (Azucena, japonica). Cela devait permettre de déterminer ce qui serait le plus

déterminant sur l'expression des gènes : le fond génétique sur l'ensemble du génome ou bien au niveau du locus, ou au contraire si la seule présence de *Pi33* suffirait à homogénéiser les niveaux d'expression entre les différents descendants. Cependant, du fait de fortes variations du niveau d'expression des gènes, cette expérience n'a pas permis de conclure sur l'influence de *Pi33* sur l'expression de ces gènes. Une expérimentation avec des gènes marqueurs de la résistance plus nombreux et plus adaptés et avec un plus grand nombre de descendants serait nécessaire. Une analyse plus précise sera possible lorsque le gène *Pi33* aura été cloné. En effet, il sera alors possible de mesurer l'expression de ces différents gènes dans des fonds génétiques ne différant strictement que pour *Pi33*. Bien que la position du site d'insertion puisse également intervenir, il devrait être alors possible de comparer les voies de signalisation dans des conditions plus contrôlées. Par exemple, il sera alors possible de comparer l'effet, de souches isogéniques pour *ACE1* et un autre gène d'avirulence cloné comme *AvrPita,* sur des variétés isogéniques transformées avec *Pi33* et/ou *Pita*.

IV.3.3 Matériels et Méthodes

a Matériel végétal et fongique

Pour cette étude nous avons extrait des ARN issus de différentes interactions compatibles et incompatibles (Tableau 4.2).

La variété IR64 (porteuse de *Pi33*) a été inoculée avec deux souches isogéniques de *M. oryzae*. La souche sauvage PH14, virulente vis-à-vis de *Pi33*, a été transformée avec le cosmide 31C12 d'une banque d'une souche avirulente (Böhnert *et al.*, 2004). Ce cosmide contient *ACE1*. La variété Nipponbare a été inoculée de manière indépendante avec les souches CL26 et CL3.6.7. Dans les deux cas, des symptômes de type HR ont été observés (Figure 4.7). Les variétés isogéniques C101LAC (porteuse de *Pi1* et *Pi33*) et C104LAC (porteuse de *Pi1*) ont été inoculées avec la souche IN81. Cette souche est avirulente sur *Pi33* et virulente sur *Pi1*. La variété C101LAC a été inoculée avec la souche avirulente BG1 et la variété C104LAC a été inoculée avec la souche avirulente CD69. La variété japonica Azucena a été inoculée de manière indépendante avec deux souches isogéniques de *M. oryzae*. La souche sauvage CM28 ne contient pas *ACE1* et a été transformée avec le cosmide 31C12 (Böhnert *et al.*, 2004). Huit descendants issus du croisement IR64 x Azucena ont été inoculés avec la souche avirulente vis-à-vis de *Pi33,* IN81.

b Données moléculaires

L'extraction d'ARN, la définition des amorces et leur optimisation, le protocole de rétrotranscription et de PCR quantitative sont décrits dans Vergne *et al.* (2007). La liste des

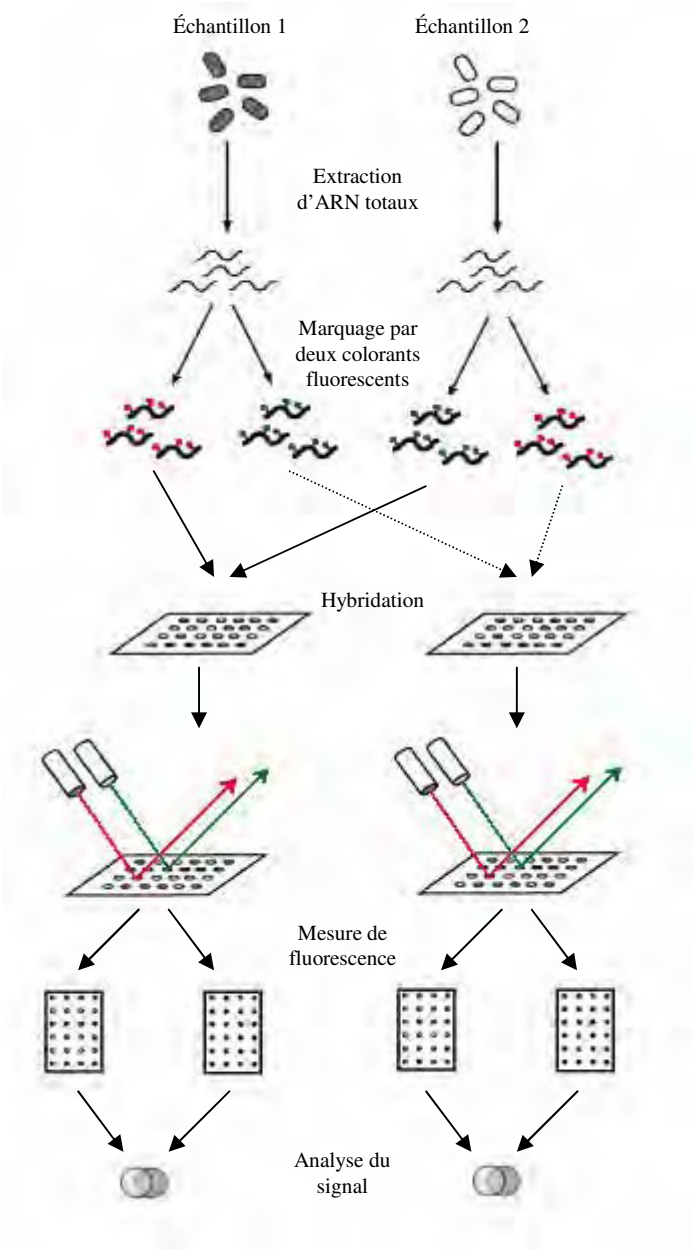


Figure 4.8. Hybridation sur puce à ADN.

Pour une série d'analyses, deux échantillons sont hybridés simultanément sur une même puce. Ces échantillons correspondent à la comparaison qui doit être effectuée (Inoculé/Non inoculé ou Inoculé incompatible/Inoculé compatible). Pour chaque échantillon deux marquages différents sont effectués et ainsi deux données d'expression sont obtenues qui correspondent à chacun des deux marquages. Une réplication technique de cette analyse est ensuite effectuée qui permet d'obtenir deux autres données d'expression. Une répétition biologique est effectuée dans les mêmes conditions qui permet d'obtenir quatre autres données d'expression.

amorces utilisées pour les gènes identifiés à partir de l'expérience « B8 » est disponible dans l'annexe 9.

La méthode d'analyse de l'expression des gènes à partir des données obtenues lors des premières hybridations sur puce (expérience « Agilent ») est décrite dans Vergne *et al.* (2007). Le marquage de l'ARN et l'hybridation ont été réalisés selon le protocole proposé par le fabriquant de la puce (Agilent oligo G4137A, www.chem.agilent.com). Pour la deuxième série d'hybridations (expérience « B8 »), les puces à ADN utilisées sont les puces Opéron de 60 000 gènes de riz (Génoplante, non publié). Deux répétitions biologiques avec chacune deux répétitions techniques pour chaque colorant fluorescent ont été utilisées pour obtenir 8 valeurs d'expression par gène (Figure 4.8). La normalisation a été faite par la méthode d'analyse de Arraytools (Le *et al.,* soumis ; Tusher *et al.*, 2001). Tous les gènes avec un ratio d'expression par rapport au témoin non inoculé supérieur à 1.5 ou inférieur à 0.69 ont été considérés comme différentiellement exprimés.

V Conclusion générale

Cette thèse s'est articulée autour de trois objectifs principaux. Il s'agissait tout d'abord de déterminer l'origine de *Pi33* ainsi que sa structuration dans les deux principales sous-espèces de riz, *O. sativa japonica* et *O. sativa indica*, ainsi qu'au sein du genre *Oryza*. Le deuxième objectif central de cette thèse était de caractériser la diversité au niveau du locus *Pi33* et de cloner l'allèle de résistance de *Pi33*. Enfin, le dernier objectif était de replacer l'interaction *ACE1/Pi33* dans le contexte des réactions de défense de la plante et de comparer les profils d'expression de gènes marqueurs des réactions de défense dans différentes conditions d'interactions incompatibles et compatibles.

Ce travail a abouti à la publication de deux articles et à la soumission d'un article de revue. Il a permis également la création d'une base de données qui sera un outil précieux pour la communauté internationale Riz/*M. oryzae*.

V.1 Création d'une base de données Riz/M. oryzae

De nombreuses études de génétique de la résistance à la pyriculariose ont été produites mais aucune synthèse n'était disponible. Afin de pouvoir discuter nos résultats, il nous a paru nécessaire de faire une revue de la littérature existante sur les gènes et QTL de résistance identifiés et cartographiés. Cette synthèse a permis la rédaction d'un article de revue qui a été soumis (Molecular Plant-Microbe Interactions).

Alors que les articles les plus récents répertorient une quarantaine de gènes de résistance, cette analyse bibliographique a permis de répertorier 85 gènes et 350 QTL de résistance décrits. Ils ont pu être repositionnés physiquement sur le génome de la variété séquencée Nipponbare. A partir de ces données de QTL, une méta-analyse a permis de résumer le jeu de données de 350 QTL à 170 MetaQTL. Pour chacun de ces MetaQTL des informations sont disponibles sur son spectre de résistance (nombre d'isolats avirulents par rapport au nombre d'isolats testés) et sur son phénotype de résistance (résistance partielle ou autre). Ces informations ont été ajoutées dans la base de données OrygenesDB (http://orygenesdb.cirad.fr/index_fr.htm) et baptisées ARCHIPELAGO. Ces données génétiques ont été comparées avec des données d'annotation et des données d'expression. En effet, la cartographie physique de 1 200 analogues de gènes de résistance (RGA) est également disponible sous la base de données ainsi que la position de 4 500 gènes impliqués dans les réactions de défense d'après la littérature. En testant les colocalisations entre ces différents types de données nous avons pu en particulier émettre des hypothèses sur les gènes qui régiraient les QTL de résistance partielle. Ainsi, contrairement aux gènes de résistance cartographiés, les RGA ne colocalisent pas de manière significative avec les QTL de résistance partielle. De même, aucune colocalisation significative n'a été mesurée avec les gènes de défense.

Des analyses complémentaires de certains petits MetaQTL devraient permettre de compléter les connaissances sur les gènes qui régissent ce type de QTL. D'autre part, ce travail a également permis de montrer que, en dépit d'une idée reçue, les QTL de résistance partielle n'ont pas un spectre de résistance plus large que les gènes de résistance classiques.

D'autre part, si la communauté scientifique riz/*M. oryzae* participe à sa mise à jour régulière, cette base de données pourra rassembler les différentes connaissances génétiques et transcriptomiques acquises sur l'interaction riz-*M. oryzae*. Ces données sont utilisables en sélection en facilitant la sélection assistée par marqueur. En effet, cette étude permet de mettre en relief quelques zones du génome qui présenteraient une résistance quantitative robuste et à spectre large.

V.2 Une origine ancienne de Pi33

L'analyse de la structuration de *Pi33* chez les riz cultivés a permis de confirmer qu'au moins deux sources de résistance ont été utilisées dans les croisements qui ont donné les variétés modernes de riz indica demi naines : la variété traditionnelle TYC, et le riz sauvage *O. rufipogon* IRGC101508. D'autres sources ont également pu être utilisées mais elles n'ont pas pu être identifiées. Dans le cas de la variété IR64, qui est une des variétés les plus connues de la révolution verte, une introgression de 5,3 à 7,1 Mbp du riz sauvage IRGC101508 a été mise en évidence et a fait l'objet d'une publication (Ballini *et al.*, 2007).

Le fait que plusieurs sources de résistance existent, avec des haplotypes relativement différents, peut s'interpréter de différentes façons. Dans la première hypothèse, deux gènes différents au même locus reconnaîtraient le même gène d'avirulence. Dans la deuxième hypothèse, les deux sources de résistance porteraient le même gène. Les haplotypes observés seraient soit un seul et même allèle, soit plusieurs allèles issus d' introgressions différentes.

En dépit du fait que *Pi33* soit relativement fréquent chez les *Oryza sativa* indica avec une fréquence moyenne autour de 15% et qu'il soit présent chez plusieurs espèces de riz génétiquement et géographiquement très éloignées (*O. barthii* et *O. latifolia*), le gène est absent de certaines espèces et sous-espèces. L'origine ancienne de *Pi33* semble ainsi confirmée, avec une disparition du gène dans certaines espèces du fait de goulots d'étranglement ou d'un coût adaptatif dû à la présence de *Pi33*.

Peu de cas d'origine ancienne de gènes de résistance sont ainsi documentés en utilisant un échantillon aussi large d'espèces cultivées et sauvages. La présence d'allèle(s) de résistance de *Pi33* dans des génomes différents, ouvre la possibilité d'étudier l'évolution du cluster dans plusieurs

espèces, afin de mettre en évidence les mécanismes génétiques qui ont permis le maintien ou la disparition du gène chez certaines d'entre elles.

V.3 Une cartographie physique de Pi33

Pi33 a été cartographié physiquement dans trois accessions de riz et, au total, la cartographie physique chez quatre variétés de riz cultivé et dans sept variétés de riz sauvage seront bientôt disponibles. Le gène est situé sur le chromosome 8 dans un cluster d'analogues de gènes de résistance. Une séquence complète du cluster a été annotée dans deux variétés sensibles (Nipponbare et 93-11) et une séquence partielle est disponible dans la variété résistante IR64. Cette cartographie a mis en évidence des déviations de la colinéarité au niveau du cluster entre ces trois variétés ainsi qu'une histoire évolutive complexe du cluster faisant intervenir plusieurs épisodes de duplication. Le cluster semble donc suivre le modèle classique d'évolution des familles de gènes de résistance, avec une évolution par duplication puis divergence de type « birth and death ».

Les NBS-LRR du cluster apparaissent comme les candidats les plus probables pour *Pi33*. Des complémentations sont en cours pour ces candidats. Cependant, la structure en cluster ne favorise pas le travail de clonage. D'autre part, plusieurs mutants ont été mis en évidence dont la caractérisation pour ces gènes candidats est également en cours.

L'hypothèse selon laquelle deux gènes différents confèrent la résistance à ce locus ne peut pas être rejetée. Le clonage dans plusieurs variétés résistantes autres que IR64 sera à envisager pour vérifier cette hypothèse. Si elle devait se confirmer cela soulignerait encore l'originalité de l'interaction *ACE1/Pi33*.

V.4 Influence de Pi33 sur les voies de défense

Notre objectif était de mettre en évidence l'activité de nouveaux gènes de défense, spécifiques de la résistance, voire spécifiques de l'interaction *ACE1/Pi33*. En effet, du fait de son originalité l'interaction *ACE1/Pi33* pourrait induire des mécanismes de défense différents de ceux impliqués dans d'autres interactions de type gène-pour-gène, au moins durant les phases précoces suivant la reconnaissance. A partir d'analyses de transcription, nous avons défini un jeu de 34 gènes marqueurs des réactions de défense. Cette étude a confirmé que les gènes impliqués dans les interactions incompatibles étaient également exprimés dans le cadre d'interactions compatibles.

Les résultats préliminaires issus de la publication écrite en collaboration avec les autres membres de l'équipe (Vergne *et al.*, 2007), permettaient d'énoncer deux hypothèses pour expliquer des différences d'expression entre interactions incompatibles : soit l'expression dépend du gène de résistance (ici *Pi33*), soit elle dépend du fond génétique. Pour tester ces hypothèses nous avons comparé l'expression de gènes sur des cinétiques (16h, 24h et 48h) après inoculation dans le cadre de plusieurs interactions incompatibles faisant intervenir différents couples gène R/gène AVR, dont plusieurs porteurs de *Pi33*. A partir du jeu de gènes mis en évidence précédemment sept gènes ont donc été sélectionnés pour être testés dans ces nouvelles conditions de réactions incompatibles. Les résultats obtenus mettent en évidence une forte homologie des réponses de défense dans le cadre des interactions faisant intervenir *Pi33* malgré des fonds génétiques différents. Ainsi, la présence d'un même gène de résistance pourrait avoir une influence plus importante qu'un fond génétique similaire sur la cinétique d'expression des gènes de défense sélectionnés.

V.5 Perspectives à moyen terme : après le clonage

Le clonage de *Pi33* devrait permettre de répondre aux principales questions soulevées au cours de cette thèse :

- *Pi33* correspond-t'il à un gène unique avec un ou plusieurs allèles ou bien à plusieurs gènes situés au même locus conférant la même résistance ? Pour répondre à cette question, cela supposera de cloner *Pi33* à partir de différents fonds génétiques, en particulier dans les variétés TYC, C101LAC, ZYQ8 mais également dans les accessions sauvages dans lesquelles le gène a pu être détecté. Si plusieurs allèles sont clonés, confèreront-ils le même spectre de résistance ou le même niveau de résistance ?

- Qu'est-ce qui fait la spécificité de la reconnaissance ? Il devrait être possible de fabriquer des chimères à partir des différents domaines du gène afin d'identifier quels sont les acides aminés qui confèrent la spécificité. L'analyse des mutants identifiés au cours de cette thèse devrait également permettre de mettre en évidence des acides aminés essentiels à la fonction du gène de résistance.

- Comment *Pi33* interagit avec le métabolite secondaire produit par *Ace1* ? Quel est le rôle de *Pi33* ? L'originalité du gène *Ace1* est qu'il code pour une enzyme qui n'est pas sécrétée et qui participerait à la synthèse d'un métabolite secondaire. Ce métabolite secondaire pourrait être un effecteur qui vise les défenses de la plante ou une toxine. *Pi33* pourrait agir comme protection en neutralisant ce métabolite secondaire ou en le détoxifiant.

- Quelle est la place de *Pi33* dans le système de défense de la plante ? Nous avons tenté de mettre en évidence une influence du fond génétique en utilisant des descendants SSD porteurs de *Pi33*. Cependant, ce type de matériel végétal n'est pas idéal pour ce type d'étude. En introduisant *Pi33* dans différents fonds génétiques, et notamment dans des fonds indica et japonica, l'influence de *Pi33* sur le système de défense par rapport à l'influence du fond génétique pourra être comparé de manière plus fiable.

Pour conclure, l'étude du gène de résistance *Pi33* nécessite encore des efforts, notamment techniques pour permettre le clonage, mais les résultats devraient aboutir à un modèle d'interaction gène R/ gène AVR original.

VI Bibliographie

A

Abe S (2004) Breeding of a Blast Resistant Multiline Variety of Rice, Sasanishiki BL. Japan Agricultural Research Quarterly 38:149-154

Abramovitch RB, Kim YJ, Chen SR, Dickman MB, Martin GB (2003) Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. EMBO Journal 22:60-69

Ade J, DeYoung BJ, Golstein C, Innes RW (2007) Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:2531-2536

Agrawal GK, Rakwal R, Jwa N-S, Agrawal VP (2001) Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice OsPR1a and OsPR1b genes: A model illustrating components participating during defence/stress response. Plant Physiology and Biochemistry 39:1095-1103

Agrios GN (1988) Plant pathology, Vol. Academy Press, New York and London

Ahn S, Anderson JA, Sorrells ME, Tanksley SD (1993) Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. Molecular and General Genetics 241:483-490

Albrecht M, Domingues F, Schreiber S, Lengauer T (2003) Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. FEBS Letters 554:520-528

Arraudeau M (1998) Le riz irrigué, Vol. Maisonneuve et Larose, Paris, France

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. 415:977-983

Ashfield T, Ong LE, Nobuta K, Schneider CM, Innes RW (2004) Convergent evolution of disease resistance gene specificity in two flowering plant families. Plant Cell 16:309-318

Ausubel F (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? Nat Immunol 6:973-979

Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J, Takahashi A, Noel L, Sadanandom A, Casais C, Parker J, Shirasu K (2006) Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. Embo Journal 25:2007-2016

B

Bai J, Pennill LA, Ning J, Lee SW, Ramalingam J, Webb CA, Zhao B, Sun Q, Nelson JC, Leach JE, Hulbert SH (2002) Diversity in Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes in Cereals. Genome Research 12:1871-1884

Bakker EG, Toomajian C, Kreitman M, Bergelson J (2006) A genome-wide survey of R gene polymorphisms in Arabidopsis. Plant Cell 18:1803-1818

Ballini E, Berruyer R, Morel JB, Lebrun MH, Notteghem JL, Tharreau D (2007) Modern elite rice varieties of the 'Green Revolution' have retained a large introgression from wild rice around the *Pi33* rice blast resistance locus. New Phytologist 175:340-350

Bastiaans L (1991) Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. Phytopathology 81:611-615

Baumgarten A, Cannon S, Spangler R, May G (2003) Genome-level evolution of resistance genes in Arabidopsis thaliana. Genetics 165:309-319

Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl JL (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. Current Opinion in Plant Biology 7:391-399

Bennetzen JL (2000) Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: Microcolinearity and its many exceptions. Plant Cell 12:1021-1029

Bent AF, Mackey D (2007) Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. Annual Review of Phytopathology 45:399-436

Berruyer R (2003) Etude des interactions riz-*Magnaporthe grisea*. Caractérisation et clonage du gène de résistance *Pi33*. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie De Montpellier

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH, Tharreau D (2003) Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1*. Theoretical and Applied Genetics 107:1139-1147

Beynon J (2007) The Pathogenicity effectors of Hyaloperonospora parasitica XIIIème MPMI, Sorrento, Italie, p 60

Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:3135-3140

Bieri S, Mauch S, Shen Q-H, Peart J, Devoto A, Casais C, Ceron F, Schulze S, Steinbiss H-H, Shirasu K, Schulze-Lefert P (2004) RAR1 Positively Controls Steady State Levels of Barley

MLA Resistance Proteins and Enables Sufficient MLA6 Accumulation for Effective Resistance. Plant Cell 16:3480-3495

Bisgrove SR, Simonich MT, Smith NM, Sattler A, Innes RW (1994) A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for two different pathogen avirulence genes. Plant Cell 6:927–933

Bittner-Eddy PD, Crute IR, Holub EB, Beynon JL (2000) RPP13 is a simple locus in Arabidopsis thaliana for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. Plant Journal 21:177-188

Bohnert HU, Fudal I, Dioh W, Tharreau D, Notteghem JL, Lebrun MH (2004) A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. The Plant Cell 16:2499-2513

Bonman JM (1992) Durable resistance to rice blast disease - environmental influences. Euphytica 63:115-123

Bossolini E, Krattinger SG, Keller B (2006) Development of simple sequence repeat markers specific for the Lr34 resistance region of wheat using sequence information from rice and *Aegilops tauschii*. Theoretical and Applied Genetics 113:1049-1062

Brar DS, Khush GS (1997) Alien introgression in rice. Plant Molecular Biology 35:35-47

Brueggeman R, Rostoks N, Kudrna D, Kilian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B, Kleinhofs A (2002) The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:9328-9333

Bryan GT, Wu K-S, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000) A Single Amino Acid Difference Distinguishes Resistant and Susceptible Alleles of the Rice Blast Resistance Gene Pi-ta. Plant Cell 12:2033-2046

Burch-Smith TM, Schiff M, Caplan JL, Tsao J, Czymmek K, Dinesh-Kumar SP (2007) A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. Plos Biology 5:501-514

Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, vanDaelen R, vanderLee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Topsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley *mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. Cell 88:695-705

Cheong YH, Moon BC, Kim JK, Kim CY, Kim MC, Kim IH, Park CY, Kim JC, Park BO, Koo SC, Yoon HW, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Cho MJ (2003) BWMK1, a Rice Mitogen-Activated Protein Kinase, locates in the nucleus and mediates Pathogenesis-Related gene expression by activation of a transcription factor. Plant Physiology 132:1961-1972

Chern M, Canlas PE, Fitzgerald HA, Ronald PC (2005) Rice NRR, a negative regulator of disease resistance, interacts with Arabidopsis NPR1 and rice NH1. The Plant Journal 438:623-635

Chern MS, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC (2005) Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. Molecular Plant-Microbe Interactions 18:511-520

Chern M-S, Fitzgerald HA, Yadav RC, Canlas PE, Dong X, Ronald PC (2001) Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis. The Plant Journal 27:101-113

Chu Z, Fu B, Yang H, Xu C, Li Z, Sanchez A, Park Y, Bennetzen J, Zhang Q, Wang S (2006) Targeting *xa13*, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. Theoretical and Applied Genetics 112:455-461

Chu Z, Ouyang Y, Zhang J, Yang H, Wang S (2004) Genome-wide analysis of defense-responsive genes in bacterial blight resistance of rice mediated by the recessive R gene *xa13*. Molecular Genetics and Genomics 2719:111-120

Cloutier S, McCallum B, Loutre C, Banks T, Wicker T, Feuillet C, Keller B, Jordan M (2007) Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum L.*) is a member of the large psr567 gene family. Plant Molecular Biology 65:93-106

Collemare J, Pianfetti M, Vial M, Houlle A, Morin D, Camborde L, Gagey M, Lebrun MH, Bohnert H (2007) *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1* belongs to an infection specific gene cluster involved in secondary metabolism. submited

Couch BC, Fudal I, Lebrun MH, Tharreau D, Valent B, Pham van K, Notteghem JL, Kohn LM (2005) Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. Genetics 170:613-630

D

Dai L, Liu X, Xiao Y, Wang G (2007) Recent advances in cloning and characterization of disease resistance genes in rice. Journal of Integrative Plant Biology 49:112-119

Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in Plant-Microbe interactions. Plant Cell 8:1793-1807

Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411:826-833

Dardick C, Ronald P (2006) Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. Plos Pathogens 2:14-28

Day PR (1974) Genetics of host-parasite interaction, Vol. Freeman, W.H., San Fransico, USA

Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeyer C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 43412:980-986

Debener T, Lehnackers H, Arnold M, Dangl JL (1991) Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. Plant Journal 1:289-302

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature 394:585-588

Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. Proceedings of the National Academy of Sciences 100:8024-8029

Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:2404-2409

Devos KM (2005) Updating the `Crop Circle'. Current Opinion in Plant Biology 8:155-162

Devoto A, Turner JG (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. Annals of Botany 92:329-337

Dievart A, Clark SE (2003) Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. Current Opinion in Plant Biology 6:507-516

Dievart A, Clark SE (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. Development 131:251-261

Dinesh-Kumar SP, Baker BJ (2000) Alternatively spliced N resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:1908-1913

Dioh W, Tharreau D, Notteghem JL, Orbach MJ, Lebrun MH (2000) Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. Molecular plant-microbe interactions 139:217-227

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

Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CIA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:8888-8893

Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Ayliffe MA, Ellis JG (2004) The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. Plant Cell 16:755-768

Dodds PN, Lawrence GJ, Ellis JG (2001) Contrasting modes of evolution acting on the complex N locus for rust resistance in flax. Plant Journal 27:439-453

Droc G, Ruiz M, Larmande P, Pereira A, Piffanelli P, Morel JB, Dievart A, Courtois B, Guiderdoni E, Perin C (2006) OryGenesDB, a database for rice reverse genetics. Nucleic Acids Research 34:D736-740

Durner J, Shah J, Klessig DF (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends in Plant Science 2:266-274

E-F

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends in Plant Science 5:199-206

Eulgem T, Weigman VJ, Chang HS, McDowell JM, Holub EB, Glazebrook J, Zhu T, Dangl JL (2004) Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance. Plant Physiology 135:1129-1144

Ezuka A (1979) Breeding for and genetics of blast resistance in Japan. In: Proceeding of the rice blast workshop. IRRI, Los Banos, Philippines, p 27-48

Farman ML, Leong SA (1998) Chromosome Walking to the AVR1-CO39 Avirulence Gene of *Magnaporthe grisea*: Discrepancy Between the Physical and Genetic Maps. Genetics 150:1049-1058

Feltus FA, Wan J, Schulze SR, Estill JC, Jiang N, Paterson AH (2004) An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies Indica and Japonica genome alignments. Genome Research 14:1812-1819

Feng Q, Zhang YJ, Hao P, Wang SY, Fu G, Huang YC, Li Y, Zhu JJ, Liu YL, Hu X, Jia PX, Zhang Y, Zhao Q, Ying K, Yu SL, Tang YS, Weng QJ, Zhang L, Lu Y, Mu J, Lu YQ, Zhang LS, Yu Z, Fan DL, Liu XH, Lu TT, Li C, Wu YR, Sun TG, Lei HY, Li T, Hu H, Guan JP, Wu M, Zhang RQ, Zhou B, Chen ZH, Chen L, Jin ZQ, Wang R, Yin HF, Cai Z, Ren SX, Lv G, Gu WY, Zhu GF, Tu YF, Jia J, Chen J, Kang H, Chen XY, Shao CY, Sun Y, Hu QP, Zhang XL, Zhang W, Wang LJ, Ding CW, Sheng HH, Gu JL, Chen ST, Ni L, Zhu FH, Chen W, Lan LF, Lai Y, Cheng ZK, Gu MH, Jiang JM, Li JY, Hong GF, Xue YB, Han B (2002) Sequence and analysis of rice chromosome 4. Nature 420:316-320

Feuillet C, Keller B (1999) High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:8265-8270

Feuillet C, Schachermayr G, Keller B (1997) Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat. Plant Journal 11:45-52

Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublat A, Keller B (2003) Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum L.*) genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 15253-15258

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9:275-296

Fudal I, Collemare J, Bohnert HU, Melayah D, Lebrun MH (2007) Expression of *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1* is connected to the initiation of appressorium-mediated penetration. Eukaryotic Cell 6:546-554

G

Gabriel DW, Rolfe BG (1990) Working Models of Specific Recognition in Plant-Microbe Interactions. Annual Review of Phytopathology 28:365-391

Gabriels S, Vossen JH, Ekengren SK, van Ooijen G, Abd-El-Haliem AM, van den Berg GCM, Rainey DY, Martin GB, Takken FLW, de Wit P, Joosten M (2007) An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra- and intracellular resistance proteins. Plant Journal 50:14-28

Garris A, Tai T, Coburn J, Kresovich S, McCouch SR (2005) Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. Genetics 169:1631-1638

Ge S, Sang T, Lu BR, Hong DY (1999) Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:14400-14405

Gebhardt C, Valkonen JPT (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. Annual Review of Phytopathology 39:79-102

Genome SPR (2005) The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793-800

Glaszmann JC (1987) Isozymes and classification of asian rice varieties. Theoretical and Applied Genetics 74:21-30

Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology 43:205-227

Goff SA, Ricke D, Lan TH, 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 WL, 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

Gomulkiewicz R, Thompson JN, Holt RD, Nuismer SL, M.E. H (2000) Hot spots, cold spots, and the geographic mosaic theory of coevolution. Am. Nature 156:156-174

Goto K (1965) Estimating losses from rice blast in Japan. In: In: The rice blast disease. Proceedings of a symposium at IRRI, July,1963, Baltimore, Maryland, Johns Hopkins Press. pp.195-202

Gout L, Fudal I, Kuhn ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, Rouxel T (2006) Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the *Dothideomycete Leptosphaeria maculans*. Molecular Microbiology 60:67-80

Graham MA, Marek LF, Shoemaker RC (2002) PCR sampling of disease resistance-like sequences from a disease resistance gene cluster in soybean. Theoretical and Applied Genetics 105:50-57

Grant M, Lamb C (2006) Systemic immunity. Current Opinion in Plant Biology 9:414-420

Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL (1995) Structure of the arabidopsis *Rpm1* gene enabling dual-specificity disease resistance. Science 269:843-846

Grant MR, McDowell JM, Sharpe AG, Zabala MDT, Lydiate DJ, Dangl JL (1998) Independent deletions of a pathogen-resistance gene in *Brassica* and *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:15843-15848

Greenberg JT, Yao N (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cellular Microbiology 6:201-211

Guiderdoni E (1992) Progrès récents des biotechnologies du riz. Agronomie Tropical 46:137-153

Guiderdoni E, Courtois B, Huang N, McCouch SR, Ghesquière A, Lorieux M, Filloux D, Albar L, Ahmadi N, Tharreau D, Notteghem JL (2006) The IR64-Azucena mapping population. In: CGIAR (ed) France and the CGIAR: delivering scientific results for agricultural development., Washington, USA, p 34-38

Gundlach H, Muller M, Kutchan T, Zenk M (1992) Jasmonic Acid is a Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant Cell Cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences 89:2389-2393

H

Hahn M, Jungling S, Knogge W (1993) Cultivar-Specific Elicitation of Barley Defense Reactions by the Phytotoxic Peptide Nip1 from Rhynchosporium-Secalis. Molecular Plant-Microbe Interactions 6:745-754

Halterman DA, Wise RP (2004) A single-amino acid substitution in the sixth leucine-rich repeat of barley MLA6 and MLA13 alleviates dependence on RAR1 for disease resistance signaling. Plant Journal 38:215-226

Hamer JE, Howard RJ, Chumley FG, Valent B (1988) A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. Science 239:288-290

Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997) Plant disease resistance genes. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48:575-607

Han B, Xue Y (2003) Genome-wide intraspecific DNA-sequence variations in rice. Current Opinion in Plant Biology 6:134-138

Hayasaka T, Fujii H, Namai T (2005) Silicon content in rice seedlings to protect rice blast fungus at the nursery stage. Journal of General Plant Pathology 71:169-173

He C, Fong SH, Yang D, Wang GL (1999) BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. Molecular Plant-Microbe Interactions 12:1064-1073

Heath MlC (2000) Hypersensitive response-related death. Plant Molecular Biology 44:321-334

Hebert TT (1971) The perfect stage of *Pyricularia grisea*. Phytopathology 61:83-87

Hofius D, Tsitsigiannis DI, Jones JDG, Mundya J (2007) Inducible cell death in plant immunity. Seminars in Cancer Biology 17:166-187

Holland JB (2004) Breeding: Incorporation of Exotic Germplasm, Vol

Holub EB (2001) The arms race is ancient history in Arabidopsis, the wildflower. Nature Reviews Genetics 2:516-527

Hoorn RALvd, Wit PJGMd, Joosten MHAJ (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. Trends in Plant Science 7:67-71

Howard RJ, Ferrari MA (1989) Role of melanin in appressorium function. Experimental Mycology 13:403-418

Hu XY, Neill SJ, Cai WM (2003) NO-mediated hypersensitive responses of rice suspension cultures induced by incompatible elicitor. Chinese Science Bulletin 48:358-363

Huang Z, Han Y, Howell SH (2001) Effects of movement protein mutations on the formation of tubules in plant protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and Cauliflower mosaic virus movement protein. Molecular Plant-Microbe Interactions 14:1026-1031

Hubert DA, Tornero P, Belkhadir Y, Krishna P, Takahashi A, Shirasu K, Dangl JL (2003) Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. Embo Journal 22:5679-5689

Hudson RR, Kreitman M, Aguade M (1987) A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. Genetics 116:153-159

Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q (2001) Resistance gene complexes: Evolution and utilization. Annual Review of Phytopathology 39:285-312

Hwang CF, Bhakta AV, Truesdell GM, Pudlo WM, Williamson VM (2000) Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. Plant Cell 12:1319-1329

I-J

Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J (2001) slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a

null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. Plant Cell 13:999-1010

Ikeda R, Vaughan D (1991) The distribution of resistance genes to the brown planthopper in rice germplasm. Rice Genetics Newsletter 8:125-127

Isidore E, Scherrer B, Chalhoub B, Feuillet C, Keller B (2005) Ancient haplotypes resulting from extensive molecular rearrangements in the wheat A genome have been maintained in species of three different ploidy levels. Genome Research 15:526-536

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

Jalali BL, Bhargava S, Kamble A (2006) Signal Transduction and Transcriptional Regulation of Plant Defence Responses. Journal of Phytopathology 154:65-74

Jantasuriyarat C, Gowda M, Haller K, Hatfield J, Lu G, Stahlberg E, Zhou B, Li H, Kim H, Yu Y, Dean RA, Wing RA, Soderlund C, Wang GL (2005) Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. Plant Physiology 13825:105-115

Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO Journal 19:4004-4014

Jiang H, Wang C, Ping L, Tian D, Yang S (2007) Pattern of LRR nucleotide variation in plant resistance genes. Plant Science 173:253-261

Johnson LN, Noble MEM, Owen DJ (1996) Active and inactive protein kinases: Structural basis for regulation. Cell 85:149-158

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. 444:323-329

Joosten MHAJ, Cozijnsen TJ, De Wit PJGM (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. Nature 367:384-386

Jørgensen H, Jensen HP (1983) Powdery mildew resistance gene *Ml-a8* (Reglh8) in northwest European spring barley varieties. Barley Genetics Newsletter 13:51-53

Jorgensen JH (1987) Durability of barley powdery mildew resistance genes in Denmark 1963-1980. In: Durable Resistance in Crops. Proc. NAT0 Symp., Italy, p 397-399

Jung Y-H, Rakwal R, Agrawal GK, Shibato J, Kim J-A, Lee M-O, Choi P-K, Jung S-H, Kim SH, Koh H-J, Yonekura M, Iwahashi H, Jwa N-S (2006) Differential Expression of Defense/Stress-Related Marker Proteins in Leaves of a Unique Rice Blast Lesion Mimic Mutant (*blm*). Journal of Proteome Research 5:2586-2598

Jwa N, Agrawal G, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R (2006) Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. Plant Physiology and Biochemistry 44:261-273

K

Kahn RP, Libby JL (1958) The effect of environmental factors and plant age on the infection of rice by the blast fungus, Piricularia oryzae. Phytopathology 48:25-30

Kajava AV (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. Journal of Molecular Biology 277:519-527

Kang S, Sweigard JA, Valent B (1995) The PWL host specificity gene family in the blast fungus Magnaporthe grisea. Molecular Plant-Microbe Interactions 8:939-948

Katagiri S, Wu JZ, Ito YK, Karasawa W, Shibata M, Kanamori H, Katayose Y, Namiki N, Matsumoto T, Sasaki T (2004) End Sequencing and chromosomal in silico mapping of BAC clones derived from an indica rice cultivar, Kasalath. Breeding Science 54:273-279

Kato H (1974) Epidemiological aspect of sporulation by blast fungus on rice plants. JARQ 8:19-22

Katsube T, Koshimizu Y (1970) Influence of blast disease on harvests in Rice plant. 1. Effects of panicle infection on yield components and quality. Bulletin of Tohoku National Agriculture Experimental Station 39:55-96

Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 96:10922-10926

Keen NT (1982) Specific recognition in gene-for-gene hostparasite systems. Advance in Plant Pathology 1:35-82

Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Gerhold D, Stayton M, Shen H, Gold S, Lorang J, Thardal-Christensen H, Dahlbeck D, Staskawicz B (1990) Bacteria expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. Molecular Plant-Microbe Interactions 3:112-121

Kellogg EA, Bennetzen JL (2004) The evolution of nuclear genome structure in seed plants. American Journal of Botany 91:1709-1725

Khush GS (1989) Multiple disease and insect resistance for increased yield stability in rice. In: Progress in irrigated rice research. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, p 79-92

Kim CY, Lee SH, Park HC, Bae CG, Cheong YH, Choi YJ, Han C, Lee SY, Lim CO, Cho MJ (2000) Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. Molecular plant-microbe interactions 1328:470-474

Kim H, Lee S, Cho J, Lee S, An G, Jwa N, Kim B, Cho YG, Han S, Bhoo S, Lee Y, Hong Y, Yi G, Park D, Hahn T, Jeon J (2005) Characterization of Rice Mutants with Enhanced Susceptibility to Rice blast. Molecules and Cells 20:385-391

Kim MC, Panstruga R, Elliott C, Muller J, Devoto A, Yoon HW, Park HC, Cho MJ, Schulze-Lefert P (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. Nature 416:447-450

Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D (2005) Two Pseudomonas syringae Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in Arabidopsis. Cell 121:749-759

Kim S, Ahn IP, Lee YH (2001) Analysis of genes expressed during rice-Magnaporthe grisea interactions. Molecular plant-microbe interactions 1432:1340-1346

Kim ST, Kim SG, Hwang du H, Kang SY, Kim HJ, Lee BH, Lee JJ, Kang KY (2004) Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Proteomics 431:3569-3578

Kim YJ, Lin N-C, Martin GB (2002) Two Distinct Pseudomonas Effector Proteins Interact with the Pto Kinase and Activate Plant Immunity. Cell 109:589-598

Kiyosawa S (1989) Breakdown of blast resistance in rice in relation to general strategies of resistance gene deployment to prolong effectiveness of disease resistance in plants. In: Leonard KJ, Fry WE (eds) Plant Disease Epidemiology - 2. Genetics, Resistance and Management, Vol 2. McGraw-Hill Publishing Company, New-York, p 283

Klessig DF, Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. Plant Molecular Biology 26:1439-1458

Kobe B, Deisenhofer J (1994) The Leucine-Rich Repeat - a versatile binding motif. Trends in Biochemical Sciences 19:415-421

Kobe B, Deisenhofer J (1995) A structural basis of the interactions between Leucine-Rich Repeats and protein ligands. Nature 374:183-186

Kottapalli KR, Kottapalli P, Agrawal GK, Kikuchi S, Rakwal R (2007) Recessive bacterial leaf blight resistance in rice: Complexity, challenges and strategy. Biochemical and Biophysical Research Communications 355:295-301

Kozaka T (1965) Control of rice blast by cultivation practices in Japan. In: IRRI (ed) The rice blast disease. Proceedings of a symposium at IRRI, July, 1963. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, USA, p 421-438

Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner RC, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C, Smeekens S, Tonelli C, Paz-Ares J, Weisshaar B (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 16:263-276

Kruijt M, Brandwagt BF, de Wit PJGM (2004) Rearrangements in the *Cf-9* disease resistance gene cluster of wild tomato have resulted in three genes that mediate *Avr9* responsiveness. Genetics 168:1655-1663

Kuang H, Ochoa OE, Nevo E, Michelmore RW (2006) The disease resistance gene *Dm3* is infrequent in natural populations of *Lactuca serriola* due to deletions and frequent gene conversions at the *RGC2* locus. The Plant Journal 47:38-48

Kuang H, Woo S-S, Meyers BC, Nevo E, Michelmore RW (2004) Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. Plant Cell 16:2870-2894

Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant Retrotransposons. Annual Review of Genetics 33:479-532

L

Lauge R, De Wit PJ (1998) Fungal avirulence genes: structure and possible functions. Fungal Genetics and Biology 24:285-297

Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG (1995) The *L6* gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. Plant Cell 7:1195-1206

Le HQ, Gaillard S, Brasileiro AC, Droc G, Severac D, Aknin C, Sabau X, Guiderdoni E, Périn C (2007) ArrayTools, a user-friendly two colors microarray analysis software for differential screening. submited

Lee MW, Qi M, Yang Y (2001) A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. Molecular Plant-Microbe Interactions 14:527-535

Leister D (2004) Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. Trends in Genetics 20:116-122

Leister RT, Dahlbeck D, Day B, Li Y, Chesnokova O, Staskawicz BJ (2005) Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. Plant Cell 17:1268-1278

Li CJ, Yang SH, Wu L, Wan JM (2006) The inductive activation of the promoter of *Pib* gene. Yi Chuan 28:689-694

Li Q, Chen F, Sun L, Zhang Z, Yang Y, He Z (2006) Expression profiling of rice genes in early defense responses to blast and bacterial blight pathogens using cDNA microarray. Physiological and Molecular Plant Pathology 68:51-60

Li Z-K, Sanchez A, Angeles E, Singh S, Domingo J, Huang N, Khush GS (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

Liu JJ, Ekramoddoullah AKM (2004) Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (Pinus monticola Dougl. ex. D. Don.). Molecular Genetics and Genomics 270:432-441

Liu J-J, Ekramoddoullah AKM (2007) The CC-NBS-LRR Subfamily in *Pinus monticola*: targeted identification, gene expression, and genetic linkage with resistance to *Cronartium ribicola*. Phytopathology 97:728-736

Liu X, Lin F, Wang L, Pan Q (2007) The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice CC-NBS-LRR gene which confers race-specific resistance to the blast fungu. Genetics 176:2541-2549

Londo JP, Chiang YC, Hung KH, Chiang TY, Schaal BA (2006) Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:9578-9583

Lopez-Gerena J (2006) Mapping QTL controlling durable resistance to rice blast in the cultivar Oryzica Llanos 5. Kansas state university

Lu BR (1999) Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae): historical perspective and current status. International Rice Research Notes 24:4-8

Lu G, Jantasuriyarat C, Zhou B, Wang GL (2004) Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. Theoretical and Applied Genetics 108:525-534

Luck JE, Lawrence GJ, Dodds PN, Shepherd KW, Ellis JG (2000) Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. Plant Cell 12:1367-1377

Luderer R, Rivas S, Nurnberger T, Mattei B, Van den Hooven HW, Van der Hoorn RAL, Romeis T, Wehrfritz JM, Blume B, Nennstiel D, Zuidema D, Vervoort J, De Lorenzo G, Jones JDG, De Wit P, Joosten M (2001) No evidence for binding between resistance gene

product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 14:867-876

Luderer R, Takken FLW, Wit PJGMd, Joosten MHAJ (2002) *Cladosporium fulvum* overcomes *Cf-2*-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. Molecular Microbiology 45:875-884

M

Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL (2003) Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. Cell 112:379-389

Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. Cell 108:743-754

Mackill DJ, Bonman JM (1992) Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. Phytopathology 82:746-749

Martin G (2007) Suppression or immunity-associated host cell death by Pseudomonas type III effector AvrPtoB XIIIéme MPMI, Sorrento, Italie

Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. Annual Review of Plant Biology 54:23-61

Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganal MW, Spivey R, Wu TY, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein-kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science 262:1432-1436

Martinez CP, Borrero J, Carabali SJ, Sanabria Y, Correa F, Giraldo OX, Tohme J (2006) Utilization of wild rice species at CIAT to broaden the genetic base of cultivated rice in Latin America. Annual Report 2006 of CIAT:25-29

May RM, Anderson RM (1983) Epidemiology and Genetics in the Coevolution of Parasites and Hosts. Proceedings of the Royal Society of London 219:281-313

McDonald JH, Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the Adh locus in Drosophila. Nature 351:652-654

McNally KL, Bruskiewich R, Mackill D, Buell CR, Leach JE, Leung H (2006) Sequencing Multiple and Diverse Rice Varieties. Connecting Whole-Genome Variation with Phenotypes. Plant Physiology 141:26-31

Meaux Jd, Mitchell-Olds T (2003) Evolution of plant resistance at the molecular level: ecological context of species interactions. Heredity 91:345-352

Medzhitov R, Janeway C (2000) The Toll receptor family and microbial recognition. Trends in Microbiology 8:452-456

Meskiene I, Hirt H (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. Plant Molecular Biology 42:791-806

Mestre P, Baulcombe DC (2006) Elicitor-mediated oligomerization of the tobacco N disease resistance protein. Plant Cell 18:491-501

Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Subramoniam S, Sobral BW, Young ND (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant Journal 20:317-332

Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang HH, Michelmore RW (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. Plant Cell 15:809-834

Meyers BC, Morgante M, Michelmore RW (2002) TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. Plant Journal 32:77-92

Midoh N, Iwata M (1996) Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. Plant & cell physiology 3739:9-18

Mizobuchi R, Hirabayashi H, Kaji R, Nishizawa Y, Satoh H, Ogawa T, Okamoto M (2002) Differential expression of disease resistance in rice lesion-mimic mutants. Plant Cell Reports 21:390-396

Mohanty CR, Gangopadhyay S (1982) Testing of blast resistance in F2 rice seedlings in different doses of nitrogen and seasons. Annals of the Phytopathological Society of Japan 48:648-658

Mondragon-Palomino M, Meyers BC, Michelmore RW, Gaut BS (2002) Patterns of Positive Selection in the Complete NBS-LRR Gene Family of Arabidopsis thaliana. Genome Research 12:1305-1315

Monosi B, Wisser RJ, Pennill L, Hulbert SH (2004) Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. Theoretical and Applied Genetics 109:1434-1447

Moore RC, Purugganan MD (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. Current Opinion in Plant Biology 8:122-128

Mori M, Tomita C, Sugimoto K, Hasegawa M, Hayashi N, Dubouzet J, Ochiai H, Sekimoto H, Hirochika H, Kikuchi S (2007) Isolation and molecular characterization of a Spotted leaf 18 mutant by modified activation-tagging in rice. Plant Molecular Biology 63:847-860

Morris ER, Walker JC (2003) Receptor-like protein kinases: the keys to response. Current Opinion in Plant Biology 6:339-342

Mucyn TS, Clemente A, Andriotis VME, Balmuth AL, Oldroyd GED, Staskawicz BJ, Rathjen JP (2006) The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase in vivo to regulate specific plant immunity. Plant Cell 18:2792-2806

Mysore KS, Ryu CM (2004) Nonhost resistance: how much do we know? Trends Plant Sci 9:97-104

N

Nakagahra M, Okuno K, Vaughan D (1997) Rice genetic resources: history, conservation, investigative characterization and use in Japan. Plant Molecular Biology 35:69-77

Nawrath C, Heck S, Parinthawong N, Metraux JP (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. The Plant Cell 1441:275-286

Nei M (2005) Selectionism and neutralism in molecular evolution. Molecular Biology and Evolution 22:2318-2342

Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BF, III, Dangl JL (2003) Recognition and response in the plant immune system. Annual Review of Genetics 37:579-609

Nishikawa T, Vaughan DA, Kadowaki K (2005) Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes. Theoretical and Applied Genetics 110:696-705

Notteghem JL, Andriatompo GM (1977) Mesure au champ de la résistance horizontale du riz à Pyricularia oryzae. Agronomie Tropicale 32:400-412

Notteghem JL (1981) Why and how to breed for upland rice varieties with horizontal resistance to blast. In: Blast and upland Rice, report and recommendations of a travelling workshop held at Goionia, Goias and Campinas, Sao Paulo, Brazil. pp. 21-22

Nukina M (1998) On the phylogenetic correlations of phytotoxins and related metabolites among blast disease fungi. In: Molecular genetics of host-specific toxins in plant disease. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, p 165-166

O

Ohme-Takagi M, Suzuki K, Shinshi H (2000) Regulation of Ethylene-induced transcription of defense genes. Plant and Cell Physiology 41:1187-1192

Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K (2001) Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 9842:759-764

Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. Plant Cell 12:2019-2032

Ou SH (1985) Blast. In: Rice diseases - 2nd Edition. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, p 109-201

Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H, , Jr., Kangasjarvi J (2000) Ozone-Sensitive Arabidopsis rcd1 Mutant Reveals Opposite Roles for Ethylene and Jasmonate Signaling Pathways in Regulating Superoxide-Dependent Cell Death. Plant Cell 12:1849-1862

P

Pal KK, McSpadden Gardener B (2006) Biological Control of Plant Pathogens. In: The Plant Health Instructor

Pan Q, Liu Y, Budai-Hadrian O, Sela M, Carmel-Goren L, Zamir D, Fluhr R (2000) Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and Arabidopsis. Genetics 155:309-322

Pan QL, Wendel J, Fluhr R (2000) Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. Journal of Molecular Evolution 50:203-213

Park G, Bruno KS, Staiger CJ, Talbot NJ, Xu JR (2004) Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus. Molecular Microbiology 53:1695-1707

Parker JE, Holub EB, Frost LN, Falk A, Gunn ND, Daniels MJ (1996) Characterization of eds1, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. Plant Cell 8:2033-2046

Parlevliet JE, van Ommeren A (1975) Partial resistance of barley to leaf rust *Puccinia hordei*. II. Relationship between field trials micro plot tests and latent period. Euphytica 24:293-303

Parniske M, HammondKosack KE, Golstein C, Thomas CM, Jones DA, Harrison K, Wulff BBH, Jones JDG (1997) Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. Cell 91:821-832

Perrier X, Jacquemoud-Collet JP (2005) User's Manual for Darwin 5.0. On-line documentation.

Perrier XFABF (2003) Genetic diversity of cultivated tropical plants. Data analysis methods. In: Hamon PSMPXGJC (ed). Enfield, Science Publishers., Montpellier, p 43-76

Pieterse CM, Van Loon L (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology 7:456-464

Prabhu AS, de Faria JC (1982) Relacionamentos quantitativos entre brusone nas folhas e paniculas e seus efeitos sobre enchimento e peso dos graos em arroz de sequeiro. Pes. Agopec. Bras. 17:219-223

Q-R

Qiu D, Xiao J, Ding X, Xiong M, Cai M, Cao Y, Li X, Xu C, Wang S (2007) OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. Molecular Plant-Microbe Interactions 20:492-499

Qu S, Coaker G, Francis D, Zhou B, Wang G-L (2003) Development of a new transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector and construction of tomato and rice TAC libraries. Molecular Breeding 12:297-308

Qu S, Liu G, Zhou B, Bellizzi M, Zeng L, Dai L, Han B, Wang G-L (2006) The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat protein and is a member of a multigene family in rice. Genetics 172:1901-1914

Raghavan C, Naredo M, Wang H, Atienza G, Liu B, Qiu F, McNally K, Leung H (2007) Rapid method for detecting SNPs on agarose gels and its application in candidate gene mapping. Molecular Breeding 19:87-101

Rairdan GJ, Moffett P (2006) Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein Rx mediate LRR binding and inhibition of activation. Plant Cell 18:2082-2093

Ramakrishna W, Emberton J, SanMiguel P, Ogden M, Llaca V, Messing J, Bennetzen JL (2002) Comparative sequence analysis of the sorghum Rph region and the maize Rp1 resistance gene complex. Plant Physiology 130:1728-1738

Ramalingam J, Vera Cruz CM, Kukreja K, Chittoor JM, Wu JL, Lee SW, Baraoidan M, George ML, Cohen MB, Hulbert SH, Leach JE, 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 1644:14-24

Rauyaree R, Choi W, Fang E, Blackmon B, Dean RA (2001) Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus Magnaporthe grisea. Molecular Plant Pathology 245:347-354

Reams AB, Neidle EL (2004) Selection for gene clustering by tandem duplication. Annual Review of Microbiology 58:119-142

Ren FG, Lu BR, Li SQ, Huang JY, Zhu YG (2003) A comparative study of genetic relationships among the AA-genome Oryza species using RAPD and SSR markers. Theoretical and Applied Genetics 108:113-120

Rep M, Meijer M, Houterman PM, van der Does HC, Cornelissen BJC (2005) *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. Molecular Plant-Microbe Interactions 18:15-23

Rep M, van der Does HC, Meijer M, van Wijk R, Houterman PM, Dekker HL, de Koster CG, Cornelissen BJ (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. Molecular Microbiology 53:1373-1383

Ribot C, Hirsch J, Balzergue S, Tharreau D, Notteghem J-L, Lebrun M-H, Morel J-B Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Journal of Plant Physiology In Press, Corrected Proof

Richly E, Kurth J, Leister D (2002) Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent Arabidopsis thaliana evolution. Molecular Biology and Evolution 19:76-84

Ridout CJ, Skamnioti P, Porritt O, Sacristan S, Jones JDG, Brown JKM (2006) Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. Plant Cell 18:2402-2414

Riely BK, Martin GB (2001) Ancient origin of pathogen recognition specificity conferred by the tomato disease resistance gene *Pto*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:2059-2064

Ritter C, Dangl JL (1996) Interference between two specific pathogen recognition events mediated by distinct plant disease resistance genes. The plant cell 8:251-257

Rodrigues FA, Benhamou N, Datnoff LE, Jones JB, Belanger RR (2003) Ultrastructural and cytochemical aspects of Silicon-mediated rice blast resistance. Phytopathology 93:535-546

Rohe M, Gierlich A, Hermann H, Hahn M, Schmidt B, Rosahl S, Knogge W (1995) The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrs1 resistance genotype. EMBO Journal 14:4168-4177

Rooney HCE, van 't Klooster JW, van der Hoorn RAL, Joosten M, Jones JDG, de Wit P (2005) Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. Science 308:1783-1786

Rose LE, Langley CH, Bernal AJ, Michelmore RW (2005) Natural variation m the *Pto* pathogen resistance gene within species of wild tomato (*Lycopersicon*). I. Functional analysis of *Pto* alleles. Genetics 171:345-357

Rose LE, Michelmore RW, Langley CH (2007) Natural variation in the *Pto* disease resistance gene within species of wild tomato (*Lycopersicon*). II. Population genetics of *Pto*. Genetics 175:1307-1319

S

Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Ghesquiere A, Notteghem JL (2003) Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. Theoretical and applied genetics 10629:794-803

Sallaud C, Meynard D, van Boxtel J, Gay C, BÃ¨s M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk PBF, Rueb S, Delseny M, Guiderdoni E (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. Theoretical and Applied Genetics 106:1396-1408

Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 9748:11655-11660

Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Closing the ranks to attack by powdery mildew. Trends in Plant Science 549:343-348

See DR, Brooks S, Nelson JC, Brown-Guedira G, Friebe B, Gill BS (2006) Gene evolution at the ends of wheat chromosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:4162-4167

Shao F, Golstein C, Ade J, Stoutemyer M, Dixon JE, Innes RW (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. Science 301:1230-1233

Sharma TR, Madhav MS, Singh BK, Shanker P, Jana TK, Dalal V, Pandit A, Singh A, Gaikwad K, Upreti HC, Singh NK (2005) High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the Pi-k(h) supercript stop gene of rice, which confers resistance to Magnaporthe grisea. Molecular Genetics and Genomics 274:569-578

Shen QH, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ülker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. Science 315:1098-1103

Shigyo T, Kuchii Y, Araki Y, Sawada H (2002) Efficacy of carpropamid against mutants of *Magnaporthe grisea* at codon 75 on scytalone dehydratase. In: in 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants, p 7

Shim KS, Cho SK, Jeung JU, Jung KW, You MK, Ok SH, Chung YS, Kang KH, Hwang HG, Choi HC, Moon HP, Shin JS (2004) Identification of fungal (*Magnaporthe grisea*) stress-induced genes in wild rice (*Oryza minuta*). Plant Cell Reports 2251:599-607

Shimono M, Yazaki J, Nakamura K, Kishimoto N, Kikuchi S, Iwano M, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, Nishiguchi M (2003) cDNA microarray analysis of gene expression in rice plants treated with probenazole, a chemical inducer of disease resistance. Journal of General Plant Pathology 69:76-82

Silué D, Notteghem JL, Tharreau D (1992) Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. Phytopathology 82:577-580

Silue D, Tharreau D, Notteghem JL (1992) Identification of *Magnaporthe grisea* avirulence genes to 7 rice cultivars. Phytopathology 82:1462-1467

Simmonds NW (1993) Introgression and incorporation. Strategies for the use of crop genetic resources. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 68:539-562

Sokal RRaMCD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bulletin 38:1409-1438

Song WY, Pi LY, Wang GL, Gardner J, Holsten T, Ronald PC (1997) Evolution of the rice *Xa21* disease resistance gene family. Plant Cell 9:1279-1287

Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. Science 270:1804-1806

Song Z, Cox R, Lazarus C, Simpson TJ T (2004) Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. Chembiochem 5:1196-1203

Song ZP, Lu BR, Zhu YG, Chen JK (2003) Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. New Phytologist 157:657-665

Staden R, Beal KF, Bonfield JK (1998) Staden Package, 1998. Computer Methods in Molecular Biology. In: Misener S, Krawetz SA (eds) Bioinformatics Methods and Protocols. The Humana Press Inc., Totowa, p 115-130

Stahl EA, Dwyer G, Mauricio R, Kreitman M, Bergelson J (1999) Dynamics of disease resistance polymorphism at the Rpm1 locus of Arabidopsis. Nature 400:667-671

Sun XL, Cao YL, Wang SP (2006) Point mutations with positive selection were a major force during the evolution of a receptor-kinase resistance gene family of rice. Plant Physiology 140:998-1008

Sun XL, Cao YL, Yang ZF, Xu CG, Li XH, Wang SP, Zhang QF (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

Suzuki H (1975) Meteorological factors in the epidemiology of rice blast. Annual Review of Phytopathology 13:239-256

T

Tajima F (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. Genetics 123:585-595

Takahashi Y (1965) Genetics of resistance to the rice blast disease. In: IRRI (ed) The rice blast disease. Proceedings of a symposium at IRRI, July, 1963. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, USA, p 303-329

Takai R, Matsuda N, Nakano A, Hasegawa K, Akimoto C, Shibuya N, Minami E (2002) EL5, a rice N-acetylchitooligosaccharide elicitor-responsive RING-H2 finger protein, is a ubiquitin ligase which functions in vitro in co-operation with an elicitor-responsive ubiquitin-conjugating enzyme, OsUBC5b. The Plant Journal 30:447-455

Talbot NJ, Ebbole DJ, Hamer JE (1993) Identification and Characterization of MPG1, a Gene Involved in Pathogenicity from the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 5:1575-1590

Tameling WIL, Baulcombe DC (2007) Physical association of the NB-LRR resistance protein Rx with a ran GTPase-activating protein is required for extreme resistance to Potato virus X. Plant Cell 19:1682-1694

Tameling WIL, Elzinga SDJ, Darmin PS, Vossen JH, Takken FLW, Haring MA, Cornelissen BJC (2002) The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. Plant Cell 14:2929-2939

Tameling WIL, Vossen JH, Albrecht M, Lengauer T, Berden JA, Haring MA, Cornelissen BJC, Takken FLW (2006) Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. Plant Physiology 140:1233-1245

Tang XY, Frederick RD, Zhou JM, Halterman DA, Jia YL, Martin GB (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. Science 274:2060-2063

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. The Plant Cell 1554:317-330

Tao Y, Yuan F, Leister RT, Ausubel FM, Katagiri F (2000) Mutational analysis of the arabidopsis Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat resistance gene RPS2. The Plant Cell 12:2541-2554

Teng PS, Klein-Gebbinck HW, Pinnschmidt H (1991) An analysis of the blast pathosystem to guide modeling and forecasting. In: Rice blast modelling and forecasting. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, p 1-30

Tenhaken R, Levine A, Brisson L, Dixon R, Lamb C (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences 92:4158-4163

Tharreau D, Roumen E, Lorieux M, Price A, Dioh W, Ghesquière A, Lebrun MH, Notteghem JL (2000) New tools for resistance gene characterisation in rice. In: Tharreau D, Lebrun MH, Talbot NJ, Notteghem JL (eds) Advances in rice blast research. Proceedings of the 2nd International Rice Blast Conference, 4-8 August 1998, Montpellier, France

Thompson JN (1999) Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. American Naturalist 153:1-14

Thompson JN, Burdon JJ (1992) Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. Nature 360:121-125

Tian DC, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M (2002) Signature of balancing selection in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:11525-11530

Tiffin P, Moeller DA (2006) Molecular evolution of plant immune system genes. Trends in Genetics 22:662-670

Tokunaga Y, Kato H, Koshimizu Y (1965) Studies on the relationship between metabolism of rice plant and its resistance to blast disease. 2. Effect of the phosphorus content in leaf blades during maturity on disease proneness to leaf blast. Bulletin Tohoku National Agricultural Experimental Station 32:61-87

Ton J, De Vos M, Robben C, Buchala A, Metraux J-P, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2002) Characterization of Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. The Plant Journal 29:11-21

Tornero P, Chao RA, Luthin WN, Goff SA, Dangl JL (2002) Large-scale structure-function analysis of the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. Plant Cell 14:435-450

Tosa Y, Kusaba M, Fujiwara N, Nakamura T, Kiba A, Noda T, Furutsu Y, Noguchi H, Kato K (1995) Geographical distribution of genes for resistance to formae speciales of *Erysiphe graminis* in common wheat. Theoretical and Applied Genetics 91:82-88

Tsuji J, Jackson EP, Gage DA, Hammerschmidt R, Somerville SC (1992) Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv syringae. Plant Physiology 98:1304-1309

Tsunezuka H, Fujiwara M, Kawasaki T, Shimamoto K (2005) Proteome analysis of programmed cell death and defense signaling using the rice lesion mimic mutant cdr2. Molecular Plant-Microbe Interactions 18:52-59

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proceedings of the National Academy of Sciences 98:5116-5121

V

Valent B (1990) Rice blast as a model system for plant pathology. Phytopathology 80:33-36

Van den Ackerveken G, Van Kan J, De Wit P (1992) Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. The Plant Journal 2:359-366

Van den Burg HA, Spronk CAEM, Boeren S, Kennedy MA, Vissers JPC, Vuister GW, de Wit PJGM, Vervoort J (2004) Binding of the AVR4 Elicitor of *Cladosporium fulvum* to Chitotriose Units Is Facilitated by Positive Allosteric Protein-Protein Interactions: the chitin-binding site of avr4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. Journal of Biology and Chemistry 279:16786-16796

Van der Biezen EA, Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. Trends in Biochemical Sciences 23:454-456

Van der Fits L, Memelink J (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. Science 289:295-297

Van der Hoorn RAL, Kruijt M, Roth R, Brandwagt BF, Joosten MHAJ, De Wit PJGM (2001) Intragenic recombination generated two distinct Cf genes that mediate AVR9 recognition in the natural population of *Lycopersicon pimpinellifolium*. Proceedings of the National Academy of Sciences 98:10493-10498

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annual Review of Phytopathology 4456

Van Wees SCM, Chang H-S, Zhu T, Glazebrook J (2003) Characterization of the early response of arabidopsis to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. Plant Physiology 132:606-617

Van Wees SCM, de Swart EAM, van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CMJ (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:8711-8716

Veneault-Fourrey C, Talbot N (2005) Moving toward a systems biology approach to the study of fungal pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Advance in Applied Microbiology 57:177-215

Ventelon-Debout M, Nguyen TT, Wissocq A, Berger C, Laudie M, Piegu B, Cooke R, Ghesquiere A, Delseny M, Brugidou C (2003) Analysis of the transcriptional response to Rice Yellow Mottle Virus infection in *Oryza sativa* indica and japonica cultivars. Molecular Genetics and Genomics 27057:253-262

Vera Cruz CM, Kobayashi N, Fukuta Y (2007) Rice blast situation, research in progress, needs and priorities in 13 countries: Summary of results from blast nursery. JIRCAS Working Report 53:97-103

Vergne E, Ballini E, Marques S, Mammar BS, Droc G, Gaillard S, Bourot S, DeRose R, Tharreau D, Notteghem JL, Lebrun MH, Morel JB (2007) Early and specific gene expression triggered by rice resistance gene *Pi33* in response to infection by *ACE1* avirulent blast fungus. New Phytologist 174:159-171

Vleeshouwers VGAA, Dooijeweert Wv, Govers F, Kamoun S, Colon LT (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. Planta 210:853-864

W

Walbot V, Hoisington DA, Neuffer MG (1983) Disease lesion mimic mutations. In: Genetic Engineering of Plants. Plenum Publ. Corp., New York, NY, p 431-442

Wang GL, Ruan DL, Song WY, Sideris S, Chen LL, Pi LY, Zhang SP, Zhang Z, Fauquet C, Gaut BS, Whalen MC, Ronald PC (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 L, Pei Z, Tian Y, He C (2005) OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. Molecular Plant-Microbe Interactions 18:375-384

Wang Z, Jia Y, Rutger JN, Xia Y (2007) Rapid survey for presence of a blast resistance gene Pi-ta in rice cultivars using the dominant DNA markers derived from portions of the *Pi-ta* gene. Plant Breeding 126:36-42

Wang Z, Yamanouchi U, Katayose Y, Sasaki T, Yano M (2001) Expression of the *Pib* rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favouring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defences. Plant Molecular Biology 47:653-661

Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999) The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Plant Journal 19:55-64

Warren RF, Henk A, Mowery P, Holub E, Innes RW (1998) A mutation within the leucine-rich repeat domain of the arabidopsis disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. Plant Cell 10:1439-1452

Watkins S (2003) The World Market for crop protection

Wei FS, Gobelman-Werner K, Morroll SM, Kurth J, Mao L, Wing R, Leister D, Schulze-Lefert P, Wise RP (1999) The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. Genetics 153:1929-1948

Wen N, Chu Z, Wang S (2003) Three types of defense-responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. Molecular Genetics and Genomics 269:331-339

Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. Trends in Plant Science 6:177-183

Wing R, Kim H, Goicoechea J, Yu Y, Kudrna D, Zuccolo A, Ammiraju J, Luo M, Nelson W, Ma J, SanMiguel P, Hurwitz B, Ware D, Brar D, Mackill D, Soderlund C, Stein L, Jackson S (2007) The Oryza Map Alignment Project (OMAP): A New Resource for Comparative Genome Studies within Oryza. In: Rice Functional Genomics, p 395-409

Woloshuk CP, Sisler HD, Vigil EL (1983) Action of the antipenetrant tricyclazole, on appressoria of *Pyricularia oryzae*. Physiological Plant Pathology 22:245-259

Wu J-L, Wu C, Lei C, Baraoidan M, Bordeos A, Madamba M, Ramos-Pamplona M, Mauleon R, Portugal A, Ulat V, Bruskiewich R, Wang G, 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

X-Y

Xiao S, Emerson B, Ratanasut K, Patrick E, O'Neill C, Bancroft I, Turner JG (2004) Origin and maintenance of a broad-spectrum disease resistance locus in Arabidopsis. Molecular Biology and Evolution 21:1661-1672

Xiao SY, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li TX, Coleman M, Turner JG (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. Science 291:118-120

Xiong L, Lee MW, Qi M, Yang Y (2001) Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. Molecular plant-microbe interactions 1463:685-692

Xiong L, Yang Y (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an Abscisic Acid-inducible Mitogen-Activated Protein Kinase. Plant Cell 15:745-759

Xu Y, Chang P, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA (1994) Plant defense genes are synergistically induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. Plant Cell 6:1077-1085

Xu YB, McCouch SR, Zhang QF (2005) How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? Plant Molecular Biology 59:7-26

Yahiaoui N, Brunner S, Keller B (2006) Rapid generation of new powdery mildew resistance genes after wheat domestication. The Plant Journal 47:85-98

Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B (2004) Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. Plant Journal 37:528-538

Yamanouchi U, Yano M, Lin H, Ashikari M, Yamada K (2002) A rice spotted leaf gene, Spl7, encodes a heat stress transcription factor protein. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:7530-7535

Yang D, Parco A, Nandi S, Subudhi P, Zhu Y, Wang G, Huang N (1997) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and identification of overlapping BAC clones with chromosome 4-specific RFLP markers in rice. Theoretical and Applied Genetics 95:1147-1154

Yin Z, Chen J, Zeng L, Goh M, Leung H, Khush GS, Wang GL (2000) Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. Molecular Plant-Microbe Interactions 13:869-876

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

Z

Zeigler RS, Leong SA, Teng PS (1994) Rice blast disease, Vol. IRRI, Manilles, Philippines

Zeng LR, Qu S, Bordeos A, Yang C, Baraoidan M, Yan H, Xie Q, Nahm BH, Leung H, Wang GL (2004) Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. The Plant Cell 1665:2795-2808

Zeng L-R, Qu S, Bordeos A, Yang C, Baraoidan M, Yan H, Xie Q, Nahm BH, Leung H, Wang G-L (2004) Spotted leaf11, a Negative Regulator of Plant Cell Death and Defense, Encodes a U-Box/Armadillo Repeat Protein Endowed with E3 Ubiquitin Ligase Activity. Plant Cell 16:2795-2808

Zhang S, Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. Trends in Plant Science 6:520-527

Zhao W, Wang J, He X, Huang X, Jiao Y, Dai M, Wei S, Fu J, Chen Y, Ren X, Zhang Y, Ni P, Zhang J, Li S, Wang J, Wong GK-S, Zhao H, Yu J, Yang H, Wang J (2004) BGI-RIS: an integrated information resource and comparative analysis workbench for rice genomics. Nucleic Acids Research 32:D377-382

Zhou B, Dolan M, Sakai H, Wang GL (2007) The genomic dynamics and evolutionary mechanism of the *Pi2/9* locus in rice. Molecular Plant-Microbe Interactions 20:63-71

Zhou B, Peng KM, Chu ZH, Wang SP, Zhang QF (2002) The defense-responsive genes showing enhanced and repressed expression after pathogen infection in rice (*Oryza sativa* L.). Science in China Series C-Life Sciences 45:449-467

Zhou B, Qu SH, Liu GF, Dolan M, Sakai H, Lu GD, Bellizzi M, Wang GL (2006) The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to Magnaporthe grisea. Molecular Plant-Microbe Interactions 19:1216-1228

Zhou JM, Loh YT, Bressan RA, Martin GB (1995) The tomato gene Pti1 encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. Cell 83:925-935

Zhou T, Wang Y, Chen J-Q, Araki H, Jing Z, Jiang K, Shen J, Tian D (2004) Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. Molecular Genetics and Genomics 271:402-415

Zhu LH, Chen Y, Xu YB, Cai HW, Ling ZZ (1993) Construction of a molecular map of rice and gene mapping using a double haploid population of a cross between Indica and Japonica varieties. Rice Genetics Newsletter 10:132-134

Zhu QH, Ge S (2005) Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus *Oryza* revealed by intron sequences of four nuclear genes. New Phytologist 167:249-265

Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Li Y, Chen J, Fan J, Yang S, Hu L, Leung H, Mew TW, Teng PS, Wang Z, Mundt CC (2000) Genetic diversity and disease control in rice. Nature 406:718-722

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. Cell 125:749-760

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. Nature 428:764-767

VII Annexes

VII.1 Annexe 1 : préparation d'inoculum et inoculation avec Magnaporthe oryzae

VII.1.1 Culture de *M. oryzae*

Les souches de *M. oryzae* sont cultivées 10 jours sur milieu farine de riz (Agar 15 g/L, Farine de riz 20 g/L, Extrait de levure 1,5 g/L), à 28°C, avec une alternance de lumière et d'obscurité de 12h/12h. Afin de limiter l'évaporation, les boîtes sont scellées avec du ruban adhésif (Tesa© 5280).

VII.1.2 Préparation de l'inoculum et inoculation

La culture est mise en suspension dans 5 ml d'H_2O stérile puis la suspension est filtrée à travers une gaze. La concentration en spore est quantifiée à l'aide d'une cellule de Malassez. L'inoculation se fait 20 à 30 jours après semis, soit au stade 3-4 feuilles. Elle se fait par pulvérisation, à l'aide d'un pistolet à air comprimé, d'une suspension à 50 000 spores/mL dans une solution à 1% de gélatine. La gélatine permet aux spores d'adhérer à la surface des feuilles. Les plantes sont ensuite maintenues dans une cellule à 25°C à 100% d'humidité pendant 12 à 24h. Pour les expériences nécessitant le prélèvement d'ARN, un témoin considéré comme non inoculé, est inoculé avec de la gélatine seule à 1%.

La lecture des symptômes se fait 7 à 10 jours après l'inoculation. Des notes sont attribuées aux symptômes à l'aide d'une échelle dérivée de celle de Notteghem (1981) (cf. Figure 2.17 Chapitre 1).

VII.2 Annexe 2 : Culture du riz en serre

VII.2.1 Semis

Les semis sont réalisés dans des terrines de semis de 30 x 50 x 7 cm. On sème 320 graines par terrine environ (16 rangs de 20) dans un substrat à base de terreau (7/8èmes de Terreau (Neuhaus n°9), 1/8ème de Pouzzolane).

VII.2.2 Condition de culture

Fertilisation :

Les semis sont arrosés une fois par semaine avec 1 L d'une solution nutritive (Algospeed 1,76g/L et de Ferveg 0,125 g/L).

Arrosage :

Les plantes sont arrosées de manière à maintenir le terreau toujours très humide mais pas détrempé.

Conditions de culture :

L'hygrométrie varie de 65% à 70%. La température moyenne est de 26° le jour et de 21°C la nuit. L'éclairage est de 400-600 W/m² maximum sur 12 heures.

VII.3 Annexe 3 : Phénotypes des variétés de riz cultivés O. sativa

Varieté	N° IRGC	Sous-espèce	Type	Pi33
5213		?	ND	absent
1641 xuan		Indica	ND	absent
420 Zhong-4		Indica	ND	absent
620 Zao Jian 6		Indica	ND	absent
820 zhong-8		Indica	ND	absent
86-76		?	ND	Présent
93-11		Indica	Traditionnelle	absent
Aichi Asahi	40252	Japonica	Croisement	absent
Arang	43322	Indica	Traditionnelle	absent
ARC 13829	42469	Basmati	ND	absent
Azucena		Japonica	Traditionnelle	absent
Badkalamkati	45011	Indica	Traditionnelle	absent
Bala		Indica	Croisement	Présent
Basmati 1	27798	Aus	Traditionnelle	absent
Benong	13530	Japonica	Traditionnelle	absent
Binulawan	26872	Japonica ?	Traditionnelle	absent
Black Gora	40275	Aus	Traditionnelle	absent
Bluebonnet	79023	Japonica	Croisement	absent
Bo qi zhan xuan		Indica	ND	absent
Bobai B		Indica	ND	absent
BPI-121-407	15762	Indica	Croisement	absent
BPI76	39	Indica	Croisement	absent
BW100	50657	Indica	Croisement	Présent
C039	51231	Indica	Croisement	absent
C101A51		Indica	Croisement	absent
C101LAC		Indica	Croisement	Présent
C101PKT		Indica	Croisement	absent
C101TTP-4L23		Indica	Croisement	absent
C101TTP-6		Indica	Croisement	absent
C102TTP		Indica	Croisement	absent
C103TTP		Indica	Croisement	absent
C104LAC		Indica	Croisement	absent
C104PKT		Indica	Croisement	absent
C105TTP-1		Indica	Croisement	absent
C4-63	11352	Indica	Croisement	absent
Caloro	32564	Indica	Traditionnelle	absent
Carreon		Indica	Traditionnelle	Présent
Ce 64-7		Indica	Croisement	absent
Chahora 144	27869	basmati ?	Traditionnelle	absent
Champa Tong 54	30238	Aus	Traditionnelle	absent
Chang Wan Jing		Japonica	ND	absent
Chao liu zhan 1		Indica	ND	absent
Chau	56036	Indica	Traditionnelle	absent
Chitraj (DA23)	6208	Indica	Croisement	absent
Chokoto	32567	Indica	Traditionnelle	absent
Chow-Sung	2171	Japonica	Traditionnelle	absent
Chuan 4	17052	Aus	Traditionnelle	absent
Chun Jiang 683		Japonica	ND	absent
CI 5173	3970	?	Croisement	absent
Cina		Indica	Traditionnelle	absent
CO18		Indica	Croisement	absent
CO25		Indica	Croisement	absent
CO39		Indica	Croisement	absent
CPSLO17		Indica	Croisement	absent
DA 1	45624	Indica	Traditionnelle	absent

Varieté	N° IRGC	Sous-espèce	Type	Pi33
DA 11	6046	Indica	Traditionnelle	absent
DA 16	6245	Aus ?	Traditionnelle	absent
DA 5	5855	Indica	Traditionnelle	absent
DA 7	5809	Indica	Traditionnelle	absent
DA 9	5854	Indica	Traditionnelle	absent
Darmali	27630	Basmati ?	Traditionnelle	absent
De Abril	50463	Indica	Traditionnelle	absent
Dee-Geo-Woo-Gen	123	Indica	Traditionnelle	absent
DJ8-341		Indica	Croisement	Présent
Dom Sofid	12880	Basmati	Traditionnelle	absent
Dongnong 363		Japonica	ND	absent
Dular	32561	Indica ?	Croisement	absent
E No.11		Indica	ND	absent
EH-iA-Chiu	8241	Japonica	Traditionnelle	absent
Fortuna		Japonica	Traditionnelle	absent
FR13 A	6144	Aus	Traditionnelle	absent
Fujisaka No.5		Japonica	Traditionnelle ?	absent
Fukunishiki	40257	Japonica	Croisement	absent
GEB 24		Indica ?	Traditionnelle	absent
Gogo Lempuk	43394	Japonica	Traditionnelle	absent
Guang 9308		Indica	Croisement	absent
Gui99		Indica	Traditionnelle	absent
H97-322-1		Japonica	ND	absent
Hai qing		Indica	ND	absent
Honduras	6939	Japonica	Traditionnelle	absent
II-32B		Indica	Croisement	absent
IR1529		Indica	Croisement	Présent
IR1614-389-1-1	32630	Indica	Croisement	absent
IR1721-11-13-25-2-3	32644	Indica	Croisement	Présent
IR1737-19-7-8-3	32645	Indica	Croisement	Présent
IR1833-369-1-4	32662	Indica	Croisement	absent
IR22		Indica	Croisement	absent
IR24		Indica	Croisement	absent
IR262-43-8-11	10947	Indica	Croisement	Présent
IR36		Indica	Croisement	absent
IR5		Indica	Croisement	absent
IR5657-33-2	77992	Indica	Croisement	Présent
IR579-48-1-2	11371	Indica	Croisement	absent
IR64		Indica	Croisement	Présent
IR773A-1-36-2-1		Indica	Croisement	absent
IR8		Indica	Croisement	absent
IR95-23-1-1-3	10943	Indica	Croisement	Présent
Irat13		Japonica	Croisement	absent
Irat7		Indica	Croisement	Présent
JC1	9091	Basmati	Traditionnelle	absent
JC148	9069	Aus	Traditionnelle	absent
JC91	9177	Indica	Traditionnelle	absent
Jhona 349	6307	Aus	Traditionnelle	absent
Jin 23B		Indica	ND	absent
JX17		Japonica	ND	absent
K1	40254	Japonica	Croisement	absent
K3	40259	Japonica	Croisement	absent
K59	40261	Japonica	Croisement	absent
K60		Japonica	Traditionnelle	absent
Kalamkati	45975	Aus	Traditionnelle	absent

Varieté	N° IRGC	Sous-espèce	Type	Pi33
Kalukantha	7755	Indica ?	Traditionnelle	absent
Kanto 51	484	Japonica	Croisement	absent
Kasalath		Aus	Croisement	absent
Kaw Luyoeng	27716	Indica	Traditionnelle	Présent
Keriting Tingii	19972	?	Traditionnelle	absent
Khao Gaew	24224	Basmati	Traditionnelle	Présent
Kiang-Chou-Chiu	8180	Indica ?	Traditionnelle	absent
Koshihikari		Japonica	Croisement	absent
Kusabue		Japonica	Croisement	absent
Lal Aman	46202	Indica	Traditionnelle	absent
Latisail		Indica	Traditionnelle	absent
Latnonail		Indica	ND	absent
Lijiangheigu		Indica	ND	absent
Lu yuan zhan		Indica	ND	absent
Macan Binundok	8245	Indica	Traditionnelle	absent
Magu Taiyin No.1		Indica	ND	absent
Maratelli		Japonica	Traditionnelle	absent
Mehr	12883	Basmati	Traditionnelle	absent
Mianhui 501		Indica	ND	absent
Minghui 77		Indica	Traditionnelle	Présent
Miyang 46		Indica	Croisement	Présent
MTU9	7919	Indica	Traditionnelle	absent
Mudgo	6663	Indica	Traditionnelle	absent
N 12	6298	Basmati	Croisement ?	absent
Nipponbare		Japonica	Traditionnelle	absent
NP125	32559	Indica	Traditionnelle	absent
NPE 253	38690	Japonica	Traditionnelle	absent
Padi Boenor	9147	Japonica ?	Traditionnelle	absent
Pai-Kan-Tao		Japonica	Traditionnelle	absent
Pappaku	8268	Indica	Traditionnelle	absent
Patnai 23	46531	Indica	Traditionnelle	absent
Peta	35	Indica	Croisement	absent
Phudugey	32399	Basmati ?	Traditionnelle	absent
Pi n°4		Japonica	Croisement	absent
Pin 378		Japonica	ND	absent
Pin 9695		?	ND	Présent
Pin Kaeo	5803	Indica	Traditionnelle	Présent
Pin Tawng	40673	Indica	Traditionnelle	Présent
Pratao	7937	?	Traditionnelle	absent
Qing jing 11		Indica	ND	Présent
Qing zhen 8		Indica	Croisement	absent
R 446		Indica	ND	absent
R 494		Indica	ND	absent
R 530		Indica	ND	absent
Reïho	40025	Japonica	Croisement	absent
Rexoro	1715	Japonica	Traditionnelle	absent
RTS14	8178	Indica	Traditionnelle	absent
RTS4	8177	Indica	Traditionnelle	absent
S624 (AC 398)	8896	Indica	Croisement	absent

Varieté	N° IRGC	Sous-espèce	Type	Pi33
Seratoes Hari	8260	Indica	Traditionnelle	absent
Seraup Besar 15		Indica	Traditionnelle	absent
Shin 2		Japonica	Croisement	absent
Short Grain	5075	Aus	Traditionnelle	Présent
Shuangdounonghu		Japonica	ND	absent
Sigadis	611	Indica	Croisement	absent
Sinampaga Selection		Japonica	Traditionnelle	absent
SLO 17		Indica	Croisement	absent
Som Cau 70A	8227	Indica ?	Traditionnelle	absent
ST1	30329	Japonica	Croisement	absent
T461		Japonica	Croisement	absent
Ta Mao Tao	8194	Japonica	Traditionnelle	absent
Tadukan	9804	Indica	Traditionnelle	absent
Taichung Native 1	105	Indica	Croisement	Présent
Tam Cau-9A	8228	Indica	Traditionnelle	absent
Teqing		Indica	Traditionnelle	absent
Tetep	32576	Indica	Traditionnelle	absent
Texas Patna		Japonica	Croisement	absent
Tian hong tian		Indica	ND	absent
TKM 6	237	Indica	Traditionnelle	absent
Toride 1	40260	Japonica	Croisement	absent
Trembese	43675	Japonica	Traditionnelle	absent
Tsai-Yuan-Chon	126	Indica	Traditionnelle	Présent
Tsipala 421	10989	?	Traditionnelle	absent
Tsuyuake	40262	Japonica	Croisement	absent
Xiang zao xian 13		Indica	Croisement	absent
Xiang zao xian 19		Indica	Croisement	absent
Xiang zao xian 24		Indica	Croisement	absent
Xianghui 280		Indica	ND	absent
Xieqingzao B		Indica	Croisement	absent
Yue xin zhan 4		Indica	ND	absent
Yue ye zhan 6		Indica	ND	absent
Yue yin xuan 29		Indica	ND	absent
Zenith	32558	Indica	Traditionnelle	absent
Zhaitang		Indica	ND	absent
Zhe 733	80824	Indica	Croisement	Présent
Zhenguiai		Indica	ND	absent
Zhenshan 97B		Indica	Traditionnelle	absent
Zhong 11		Indica	ND	absent
Zhong 156		Indica	Croisement	absent
Zhong 20 Zao 55		Indica	ND	absent
Zhong 20 Zao 8		Indica	ND	Présent
Zhong 5		Indica	ND	Présent
Zhong 6		Indica	ND	Présent
Zhong 98-18		Indica	ND	absent
Zhong 98-19		Indica	ND	absent
Zhong 98-4		Indica	ND	Présent
Zhong Za0 16		Indica	ND	Présent
ZYQ8		Indica	Croisement	Présent

VII.4 Annexe 4 : Phénotypes des accessions de riz sauvages

N°	IRGC	espèce	Origine	genome	Présence de Pi33
AmL1		O. latifolia	Costa Rica	CCDD	nd
AmL4		O. latifolia	Paraguay	CCDD	nd
B5		O. barthii	Tchad	AA	Absent
B7		O. barthii	Cameroun	AA	nd
BOKARIVO-538		O. glaberrima	Mali	AA	Absent
BOUGATEBO BALEO A-515		O. glaberrima	Mali	AA	Absent
CASAMANCE V 3-1124		O. glaberrima	Sénégal	AA	Absent
CG 67-8483		O. glaberrima	Côte d'Ivoire	AA	nd
CG1		O. glaberrima	Sénégal	AA	nd
Ch83-3		O. latifolia	Chine	CCDD	Présent
DIAKAO RIMO-499		O. glaberrima	Mali	AA	Absent
DJINGA-514		O. glaberrima	Mali	AA	Absent
DN10	104685	O. rufipogon	Inde	AA	Absent
G12		O. glaberrima		AA	Absent
G8		O. glaberrima	Côte d'Ivoire	AA	Absent
GRISON GARDE-7736		O. glaberrima	Haïti	AA	nd
HT.74-19-4580		O. glaberrima	Côte d'Ivoire	AA	Absent
IRGC 100820	100820	O. ridleyi	IRRI	HHJJ	Absent
IRGC 100821	100821	O. ridleyi	Thailande	HHJJ	Absent
IRGC 100882	100882	O. australiensis	Australie	EE	Absent
IRGC 100896	100896	O. officinalis	Thailande	CC	Absent
IRGC 101141	101141	O. minuta	Philippine	BBCC	Absent
IRGC 102118	102118	O. granulata	Thailande	AA	Absent
IRGC 103410	103410	O. collina	Sri Lanka	CC	nd
IRGC 103865	103865	O. minuta	Philippine	BBCC	nd
IRGC 105491	105491	O. rufipogon	Malaysie	AA	Absent
IRGC 105690	105690	O. punctata (2x)	Kenya	BB	Absent
IRGC 96717	96717	O. glaberrima		AA	Absent
ISENOUFO-8028		O. glaberrima	Burkina Faso	AA	Absent
KPECEKRE N-236		O. glaberrima	Côte d'Ivoire	AA	Absent
LIB 210 A-3978		O. glaberrima	Liberia	AA	nd
LIB 223-3994		O. glaberrima	Liberia	AA	nd
LIB 2-3775		O. glaberrima	Liberia	AA	nd
LIB 93-3863		O. glaberrima	Liberia	AA	nd
MAMAVO-489		O. glaberrima	Mali	AA	Absent
MDG 1392-5640		O. glaberrima	Madagascar ?	AA	Absent
MDG 1395-5642		O. glaberrima	Madagascar ?	AA	Absent
NB2		O. barthii	Niger	AA	nd
NIORI-8029		O. glaberrima	Burkina Faso	AA	Absent
NIOURO-8023		O. glaberrima	Burkina Faso	AA	Absent
OA36		O. australiensis	Australie	EE	Absent
OA4		O. australiensis	Australie	EE	Absent
OR10	105282	O. meridionalis	Australie	AA	nd
OR39	105291	O. rufipogon	Australie	AA	Absent
OR54	105306	O. rufipogon	Australie	AA	Absent
OR7	105281	O. rufipogon	Australie	AA	Absent
PAPA CHEF-5295		O. glaberrima	Guinée Conakry	AA	nd
PasNum.		O. longistaminata	Madagascar	AA	Absent
S38	no	O. sativa		AA	Présent ?
S41		O. sativa		AA	nd
SANGARE-225		O. glaberrima	Côte d'Ivoire	AA	Absent
SASSOREL-508		O. glaberrima	Mali	AA	Absent
SIM SIMO-505		O. glaberrima	Mali	AA	Absent
TELE 1-504		O. glaberrima	Mali	AA	Absent
TIERIBLE-7988		O. glaberrima	Burkina Faso	AA	Absent
UL58		O. longistaminata	Cameroun	AA	Absent
W0006		O. officinalis	Sri Lanka	CC	nd
W0015		O. punctata (4X) ?		BBCC	nd
W0017		O. alta	Inde	CCDD	nd
W0021		O. officinalis		CC	nd
W0043		O. punctata (4X)		BBCC	nd
W0046		O. latifolia	Paraguay	CCDD	nd
W0048		O. latifolia	Paraguay	CCDD	nd

N°	IRGC	espèce	Origine	genome	Présence de Pi33
W0065		O. officinalis		CC	nd
W0510		Rhyncoryza. subulata	Paraguay		Absent
W0542	100914	O. latifolia	Mexique	CCDD	Présent
W0553		O. latifolia	Chine	CCDD	Absent
W0566		O. officinalis		CC	Absent
W0593	101942	O. rufipogon	Malaysie	AA	Absent
W0610	100923	O. rufipogon	Myanmar	AA	Absent
W0656		O. brachyantha	Guinée	FF	nd
W0B01		O. barthii	Botswana	AA	nd
W1023		O. punctata (4X)		BBCC	nd
W1144		O. latifolia	Paraguay	CCDD	nd
W1145		O. punctata (4X)		BBCC	nd
W1159		O. malampuzaensis	Inde		nd
W1168		O. latifolia	Costa Rica	CCDD	nd
W1177		O. latifolia		CCDD	nd
W1179		O. latifolia	Costa Rica	CCDD	Absent
W1184	100967	O. latifolia	Surinam	CCDD	Présent
W1185		O. glumaepatula	Surinam	AA	Absent
W1186		O. glumaepatula	Amérique du Nord	AA	Absent
W1191		O. glumaepatula		AA	nd
W1195		O. grandiglumis		CCDD	nd
W1196		O. glumaepatula	Amérique du Nord	AA	Absent
W1252		O. officinalis		CC	nd
W1271		O. officinalis	Brunei	CC	nd
W1308		O. officinalis		CC	nd
W1315		O. officinalis		CC	Absent
W1318		O. minuta		BBCC	nd
W1323		O. minuta	Philippines	BBCC	nd
W1330		O. minuta		BBCC	Absent
W1342		O. minuta		BBCC	Absent
W1403		O. brachyantha	Sierra Leone	FF	nd
W1408		O. punctata (4X)	Nigeria	BBCC	nd
W1467		O. barthii		AA	nd
W1515		O. punctata (2X)		BB	Absent
W1526		O. eichingeri	Ouganda	BBCC	nd
W1529		L. perrieri	Madagascar		nd
W1539		O. latifolia		CCDD	Présent
W1543	101508	O. rufipogon	Inde	AA	Présent
W1551	105601	O. rufipogon	Thailande	AA	Absent
W1574	104061	O. barthii	Nigeria	AA	Présent
W1583		O. barthii		AA	nd
W1586		O. punctata (2X)	Tchad	BB	nd
W1590		O. punctata (2X)	Cameroun	BB	nd
W1631		O. meridionalis		AA	Absent
W1638		O. meridionalis		AA	Absent
W1654	105616	O. rufipogon	Inconnu	AA	Absent
W1690	no	O. rufipogon	Thailande	AA	Présent
W1699	105628	O. rufipogon	Thailande	AA	Présent
W2077	105282	O. meridionalis	Australie	AA	nd
W2080	105285	O. meridionalis	Australie	AA	Absent
W2100	105287	O. meridionalis	Australie	AA	Absent
W2105	no	O. meridionalis	Australie	AA	Absent
W2116	105300	O. meridionalis	Australie	AA	nd
W2117	105301	O. meridionalis	Australie	AA	Présent
W2136		O. glumaepatula	Amérique du Sud	AA	Absent
W2140		O. glumaepatula		AA	nd
W2149		O. glumaepatula		AA	nd
W2173		O. glumaepatula		AA	Absent
W2184		O. glumaepatula		AA	Absent
YELE-542		O. glaberrima	Mali	AA	nd
YL244		O. longistaminata	Guinée	AA	Absent
YL354		O. longistaminata	Guinée	AA	Absent
ZAKPALE MAN-230		O. glaberrima	Côte d'Ivoire	AA	Absent
ZAKPALE-151		O. glaberrima	Côte d'Ivoire	AA	Absent
ZIGA-8475		O. glaberrima	Burkina	AA	Absent

VII.5 Annexe 5 : Génotypage de l'introgression au locus Pi33

SSR Primer	Nipponbare	Azucena	IR36	IR64	*Oryza rufipogon* IRGC 101508	TYC	ZY08	IR1529	Bala	IRA77	TN1	C101LAC	C039	C104LAC	IR8	Peta	Latisail	Geb24	Mudgo	Cina	Number of alleles	Polymorphisme *Oryza rufipogon*
	Sensible	Sensible	Sensible	Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	4	Yes
RM5647	1	2	3	4	4	3	2	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	5	Yes
RM3819	1	2	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	5	3	4	Yes
RM1376	1	1	2	2	1	3	2	2	3	3	3	1	1	1	4	3	3	1	1	1	4	Yes
RM3231	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	No
RM3572	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	3	3	3	4	4	4	5	ND	4	5	No
RM25	1	1	2	1	1	3	2	2	3	ND	3	3	3	3	2	4	4	4	4	5	5	Yes
RM4085	1	2	3	2	2	4	2	4	4	4	4	3	3	3	3	3	ND	ND	3	3	4	Yes
RM5556	1	2	3	4	4	4	2	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	Yes
RM3374	1	2	2	2	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	ND	3	3	3	3	3	3	No
RM1111	1	1	0	0	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	3	2	4	No
RM310	2	1	4	4	4	5	3	5	5	5	5	5	5	5	3	4	4	6	6	5	6	No
RM547	1	2	1	1	1	3	3	4	3	3	3	3	1	1	3	4	4	2	4	1	4	No
RM6208	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	3	3	No
RM7057	2	5	1	1	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2	2	2	2	5	No
RM SP33-41	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	1	3	3	3	No
RM SP33-53	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	ND	ND	1	3	2	3	No
RM SP33-43	2	1	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	3	3	3	2	5	No
RM SP33-44	1	2	5	5	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	6	7	8	2	2	3	8	No
RM3507	1	5	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	2	3	4	3	3	2	2	3	5	No
RM3644	3	3	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	6	6	5	2	2	2	2	1	6	No
RM72	1	1	2	2	2	4	4	2	4	3	4	4	2	4	3	3	3	5	1	1	5	No
RM SP33-6	1	2	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	5	5	5	5	5	5	No
RM SP33-17	1	1	3	3	3	4	4	2	4	4	4	4	3	3	2	4	4	5	6	4	6	No
RM SP33-30	1	ND	1	1	1	2	ND	ND	2	ND	2	2	2	2	ND	1	1	2	2	1	2	No
RM6429	1	2	3	3	3	3	4	4	3	4	3	3	4	4	3	4	4	4	4	4	4	No
RM8243	1	2	2	2	2	3	1	3	3	3	3	3	2	2	3	3	ND	3	2	2	3	No
RM6027	1	2	1	3	1	3	1	3	3	1	1	1	4	4	1	4	4	4	4	5	5	No
RM3481	1	2	3	3	3	4	3	0	4	2	4	4	3	4	5	5	5	3	0	3	5	No
RM3395	1	2	1	2	1	2	2	2	3	3	3	3	2	2	4	3	3	3	3	3	4	Yes
RM5514	1	2	3	0	3	ND	3	ND	ND	0	1	1	1	1	ND	ND	ND	4	1	2	5	Yes
RM44	1	ND	3	2	3	2	2	2	2	2	5	2	4	4	2	5	5	5	5	5	5	Yes
RM483	5	3	3	5	3	4	7	5	6	5	4	6	ND	5	5	6	ND	ND	3	4	7	Yes
RM331	1	2	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	3	ND	3	Yes
RM404	6	4	2	5	1	5	5	5	5	ND	5	5	3	5	5	5	5	5	4	1	6	Yes
RM433	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	3	Yes
RM4154	1	0	2	0	1	6	6	3	2	2	3	4	5	7	3	8	8	7	7	7	8	Yes

Les allèles microsatellites sont codés par un chiffre de 1 à 8. Pour un marqueur donné un allèle de même taille a le même chiffre. En vert allèles Nipponbare, en rouge allèles *O. rufipogon* IRGC101508, en bleu froncé allèles TYC, en bleu clair allèles C101LAC.

VII.6 Annexe 6 : Annotation des gènes du Cluster

VII.6.1 Annotation du cluster chez Nipponbare[1]

Nom du locus japonica	Synonyme	Debut Locus (bp sur chr)	Fin Locus (bp sur chr)	Taille (bp)	CloneBAC	Protéine	cDNA	Orthologue (Arabidopsis)
Os08g10244		5 943 843	5 948 383	4 540	AP004157	Rétrotransposon	AK109601	
Os08g10250	**Nip-LRK4**	5 948 559	5 952 418	3 859	AP004157	**LRR-kinase**		
Os08g10260	**Nip-NB5**	5 958 066	5 961 799	3 733	AP004157	**NBS-LRR**	AK070769	
Os08G10270		5 964 086	5 967 450	3 364	AP004157	Protéine hypothétique	AK108353	
Os08G10280		5 969 645	5 969 950	305	AP004157	Protéine hypothétique		
Os08g10290	**Nip-LRK6**	5 974 584	5 982 619	8 035	AP004157	**LRR-kinase**		
Os08g10300	**Nip-LRK7**	5 991 677	5 998 876	7 199	AP004157	**LRR-kinase**	AK065548	
Os08g10310	**Nip-LRK8**	6 009 401	6 016 936	7 535	AP003858	**LRR-kinase**	AK068816	
Os08g10320	**Nip-LRK9a**	6 025 829	6 032 813	6 984	AP003858	**LRR-kinase**		
Os08g10330	**Nip-LRK9b**	6 034 184	6 042 274	8 090	AP003858	**LRR-kinase**	AK100532	At1g56130
Os08g10340		6 049 485	6 052 675	3 190	AP003858	Protéine à Domaine F-Box	AK106289	
Os08g10350		6 056 430	6 059 051	2 621	AP003858	Transporteur GOLGI		At5g19980
Os08g10360		6 065 206	6 072 519	7 313	AP003858	Rétrotransposon		
Os08g10370		6 072 815	6 073 918	1 103	AP003858	Rétrotransposon		
Os08g10380		6 079 093	6 079 839	746	AP003858	Protéine hypothétique		
Os08g10390		6 092 034	6 094 474	2 440	AP003858	Rétrotransposon		
Os08g10400		6 096 633	6 099 056	2 423	AP003858	Protéine hypothétique	AK242966	
Os08g10410		6 106 033	6 109 322	3 289	AP004565	Protéine hypothétique	AK064331	AT2G32980
Os08g10420		6 115 476	6 117 299	1 823	AP004565	Hydroxycinnamoyltransferase		
Os08g10430	**Nip-NB10**	6 122 011	6 125 048	3 037	AP004565	**NBS-LRR**	AK119306	
Os08g10440	**Nip-NB11**	6 131 714	6 135 163	3 449	AP004565	**NBS-LRR**		
Os08g10450		6 135 784	6 138 076	2 292	AP004565	Transporteur de nucleoside	AK059439	AT1G70330
Os08g10460		6 139 415	6 144 842	5 427	AP004565	Rétrotransposon		
Os08g10470		6 148 820	6 151 471	2 651	AP004565	Protéine à domaine SET	AK103876	AT2G19640

VII.6.2 Annotation du cluster chez 93-11[2]

Nom du locus indica	Synonyme	Debut Locus (bp sur chr)	Fin Locus (bp sur chr)	Taille (bp)	Protéine	Homologue (Nipponbare)
OsIFCC025522	**93-LRK4**	6 316 607	6 321 717	5 110	**LRR-kinase**	Os08g10250
OsIFCC025523		6 324 419	6 325 792	1 373	**NBS-LRR**	
		6 338 792	6 343 000	4 208	Rétrotransposon TY1	
OsIFCC025524	**93-NB5**	6 344 528	6 347 963	3 435	**NBS-LRR**	Os08g10260
OsIFCC025525		6 351 480	6 352 097	617	Protéine hypothétique	Os08G10270
OsIFCC025526		6 355 125	6 355 824	699	Protéine hypothétique	Os08G10280
OsIFCC025527	**93-LRK6**	6 357 091	6 365 253	8 162	**LRR-kinase**	Os08g10290
OsIFCC025528	**93-LRK6b**	6 374 793	6 382 243	7 450	**LRR-kinase**	
OsIFCC025529	**93-LRK7**	6 390 854	6 398 567	7 713	**LRR-kinase**	
OsIFCC025530	**93-LRK7b**	6 407 061	6 414 453	7 392	**LRR-kinase**	Os08g10300
OsIFCC025531	**93-LRK8**	6 425 163	6 433 372	8 209	**LRR-kinase**	Os08g10310
OsIFCC025532	**93-LRK8b**	6 441 463	6 446 079	4 616	**LRR-kinase**	
OsIFCC025533	**93-LRK9a**	6 454 571	6 461 604	7 033	**LRR-kinase**	Os08g10320
OsIFCC025534	**93-LRK9b**	6 463 403	6 471 212	7 809	**LRR-kinase**	Os08g10330
OsIFCC025535		6 481 471	6 482 808	1 337	Protéine à Domaine F-Box	Os08g10340
OsIFCC042901		6 488 944	6 489 972	1 028	Transporteur GOLGI	Os08g10350
OsIFCC025536		6 502 662	6 504 576	1 914	Protéine hypothétique	
OsIFCC025537		6 517 117	6 518 480	1 363	Protéine hypothétique	
OsIFCC025538		6 529 848	6 532 961	3 113	Protéine hypothétique	Os08g10400
OsIFCC025539		6 540 413	6 541 823	1 410	Protéine hypothétique	Os08g10380
OsIFCC025540		6 551 621	6 554 130	2 509	Protéine hypothétique	Os08g10410
OsIFCC042902		6 567 407	6 567 907	500	Hydroxycinnamoyltransferase	Os08g10420
OsIFCC025541	**93-NB10**	6 575 073	6 582 997	7 924	**NBS-LRR**	Os08g10430
OsIFCC025542	**93-NB11**	6 587 033	6 590 350	3 317	**NBS-LRR**	Os08g10440
OsIFCC042904		6 591 102	6 591 906	804	Transporteur de nucleoside	Os08g10450
		6 600 993	6 612 163	11 170	Rétrotransposon gypsy	
		6 626 304	6 638 586	12 282	Rétrotransposon gypsy	
		6 645 211	6 647 234	2 023	Protéine hypothétique	
OsIFCC025543		6 648 686	6 649 820	1 134	Transporteur de nucleoside	Os08g10450
		6 658 088	6 658 592	504	Protéine à domaine SET	Os08g10470
OsIFCC025544		6 659 903	6 662 121	2 218	Protéine chaperone	Os08g10480
		6 663 554	6 664 281	727	Protéine de lien aux ions métaux	Os08G10490
OsIFCC042905		6 674 228	6 676 827	2 599	Protéine à domaine SET	Os08g10470
OsIFCC025545		6 678 338	6 680 676	2 338	Protéine de lienaux ions métaux	Os08g10480

[1] *Les annotations ont été prédites automatiquement par TIGR*
[2] *Les annotations ont été prédites par FgeneSH*

VII.6.3 Annotation du cluster chez IR64

Gène	Synonyme	Contig	Debut Locus (bp)	Fin Locus (bp)	Taille (bp)	gene fonction	Homologue (Nipponbare)
1		03M23-2	9	170	161	Rétrotransposon	Os08g10180
2		03M23-2	1303	1714	411	Rétrotransposon	
3		03M23-2	3067	6101	3034	Rétrotransposon	
4		03M23-2	8314	11829	3515	ABC transporteur	
5		03M23-2	13566	13732	166	Protéine hypothétique	
6		03M23-2	14046	15130	1084	Protéine hypothétique	Os08g10210
7		03M23-3	5343	6794	1451	Protéine cytochrome P450	Os08g10240
8		03M23-3	8412	8885	473	**LRR-kinase**	
9		03M23-3	9645	10090	445	Protéine hypothétique	
10		03M23-3	10679	22819	12140	Rétrotransposon	
11	**64-LRK4**		19256	26854	7598	**LRR-kinase**	Os08g10250
12		03M23-3	27605	28243	638	Protein similaire à un précurseur gag-pol	
13		03M23-3	29440	30161	721	Protéine hypothétique	
14	**64-NB5**	03M23-3	31915	34869	2954	**NBS-LRR**	Os08g10260
15		03M23-3	37517	39093	1576	Rétrotransposon	Os08g10270
16		03M23-3	41507	43630	2123	Fibroine	Os08g10280
17		03M23-3	44325	45019	694	Protéine hypothétique	
18	**64-LRK6**	03M23-3	48112	51506	3394	**LRR-kinase**	Os08g10290
19		03M23-4	650	3246	2596	Protéine hypothétique	
20	**64-NB10-2**	36	7999	9085	1086	**NBS-LRR**	Os08g10430
21		47	8	141	133	**NBS-LRR**	
22		47	150	3351	3201	Transposon CACTA	
23	**64-NB11-X**	52	132	174	42	**NBS-LRR**	
24		222	36757	36824	67	**NBS-LRR**	
25	**64-NB11-4,5**	222	29098	33544	4446	**NBS-LRR**	
26		222	27970	28278	308	Transporteur de nucleoside	
27		222	26125	27763	1638	Shb	
28	**64-NB11-tps**	222	23898	24755	857	**NBS-LRR**	
29		222	13096	23850	10754	Transposon CACTA	
30	**64-NB11-tps**	222	10597	12643	2046	**NBS-LRR**	
31		222	8604	10631	2027	Protéine hypothétique	
32	**64-NB11-3,5**	222	1073	4516	3443	**NBS-LRR**	Os08g10440
33		199	20796	22580	1784	Transporteur de nucleoside	Os08g10450
34		199	15779	18852	3073	Rétrotransposon	
35		199	11845	14574	2729	Protéine à domaine SET	Os08g10470
36		199	8276	10606	2330	Protéine chaperone	Os08g10480
37		199	6479	7717	1238	Protéine de lien aux ions métaux	Os08g10490
38		199	2076	5066	2990	Protéine hypothétique	
39		199	947	1890	943	Protéine hypothétique	Os08g10500

Les annotations ont été prédites par RiceGAAS et manuellement par alignement avec les séquences de références chez Nipponbare.

VII.7 Annexe 7 : Bilan de l'assemblage des clones BAC IR64

Nom contig	Clone BAC	Chromosome	nb contig	Debut Locus (bp sur chr)	Fin Locus (bp sur chr)	Taille Total Contig (bp)	Taille Total Seq. (bp)	Nb Seq.	Taux de Couverture
A	44H23	1	6	195 562	245 069	6 957	13 205	17	1.90
B	44H23	2	2	11 949 336	11 951 562	1 574	1 574	2	1.00
C	44H23	5	9	24 401 354	24 448 443	34 584	109 569	140	3.17
199+222	44H23	8	2	6 123 391	6 163 855	72 831	1 223 975	1041	18.26
D	44H23	?	2			183	318	3	1.74
10	33B02	?	1			2 773	7 021	12	2.53
15	33B02	8	1	6 665 964	6 667 875	2 636	8 234	15	3.12
19	33B02	8	1	6 133 720	6 133 430	7 487	44 365	75	5.93
23	33B02	?	1			797	797	1	1.00
24	33B02	?	1			408	408	1	1.00
25	33B02	?	1			691	691	1	1.00
26	33B02	?	1			170	170	1	1.00
36	33B02	8	1	5 927 048	6 122 721	9 130	49 063	80	5.37
37	33B02	8	1	5 927 048	6 122 603	5 505	31 314	50	5.69
42	33B02	8	1	5 963 272	5 963 355	1 313	5 496	8	4.19
44	33B02	8	1	6 124 342	6 133 891	1 821	19 235	29	10.56
47	33B02	8	1	5 923 558	6 132 554	3 351	15 463	23	4.61
49	33B02	8	1	5 926 216	5 927 049	2 208	6 149	14	2.78
50	33B02	8	1	6 122 101	6 133 908	1 734	5 897	13	3.40
51	33B02	8	1	6 122 792	6 136 036	18 195	193 613	315	10.64
52	33B02	8	1			890	2 418	5	2.72
54	33B02	8	1			1 554	2 825	5	1.82
03M23-2	03M23	8	1	5 897 477	5 916 878	15 205	Nd	Nd	Nd
03M23-3	03M23	8	1	5 921 582	5 978 867	52 349	Nd	Nd	Nd
03M23-4	03M23	?	1			3 308	Nd	Nd	Nd

A

Gène	Nip-LRK4	Nip-LRK6	Nip-LRK7	Nip-LRK8	Nip-LRK9a	Nip-LRK9b	93-LRK4	93-LRK6	93-LRK6b	93-LRK7	93-LRK7b	93-LRK8	93-LRK8b	93-LRK9a	93-LRK9b	64-LRK4	64-LRK6	64-LRK7	64-LRK8	64-LRK9a	64-LRK9b
Nip-LRK4	100.00%																				
Nip-LRK6	89.12%	100.00%																			
Nip-LRK7	81.40%	83.19%	100.00%																		
Nip-LRK8	80.06%	80.46%	81.18%	100.00%																	
Nip-LRK9a	80.54%	81.72%	81.23%	86.63%	100.00%																
Nip-LRK9b	79.82%	81.91%	80.98%	80.35%	81.06%	100.00%															
93-LRK4	96.94%	80.23%	80.39%	81.63%	78.17%	76.35%	100.00%														
93-LRK6	83.45%	98.99%	83.26%	80.15%	81.81%	82.00%	81.88%	100.00%													
93-LRK6b	82.73%	86.50%	81.94%	79.81%	80.53%	81.80%	78.76%	86.49%	100.00%												
93-LRK7	81.72%	82.98%	97.27%	80.74%	81.17%	81.16%	80.39%	83.22%	82.18%	100.00%											
93-LRK7b	81.49%	83.90%	99.38%	80.62%	81.16%	81.19%	80.39%	83.97%	82.24%	97.54%	100.00%										
93-LRK8	79.49%	80.59%	80.96%	99.52%	86.64%	80.24%	0.00%	80.18%	79.87%	80.74%	80.64%	100.00%									
93-LRK8b	82.95%	81.51%	80.82%	99.41%	86.30%	79.49%	0.00%	81.58%	79.73%	81.42%	80.65%	99.58%	100.00%								
93-LRK9a	80.95%	81.97%	81.79%	86.67%	99.25%	81.80%	78.17%	82.31%	80.78%	81.54%	82.03%	86.52%	86.09%	100.00%							
93-LRK9b	79.82%	82.01%	81.06%	80.72%	81.36%	99.42%	76.35%	82.10%	81.94%	81.25%	96.29%	80.61%	79.49%	82.04%	100.00%						
64-LRK4	99.48%	80.91%	80.54%	78.81%	77.65%	80.43%	96.94%	81.72%	80.75%	81.09%	80.68%	78.93%	82.95%	78.28%	79.80%	100.00%					
64-LRK6	84.49%	95.78%	83.84%	80.25%	80.82%	83.08%	81.70%	95.49%	85.81%	83.46%	84.19%	80.59%	80.54%	80.96%	83.13%	83.22%	100.00%				
64-LRK7	79.35%	84.19%	98.11%	80.72%	81.90%	81.09%	79.74%	84.30%	82.82%	99.50%	98.36%	80.67%	79.79%	83.07%	81.18%	78.70%	85.48%	100.00%			
64-LRK8	79.81%	82.08%	80.16%	99.02%	72.49%	80.88%	0.00%	82.14%	79.43%	80.00%	79.42%	99.22%	99.05%	85.73%	81.09%	79.31%	81.67%	78.83%	100.00%		
64-LRK9a	81.47%	82.96%	81.88%	87.70%	99.74%	81.28%	76.35%	83.16%	81.07%	81.98%	81.83%	87.75%	87.28%	99.15%	81.74%	78.15%	81.55%	82.83%	86.99%	100.00%	
64-LRK9b	81.25%	82.91%	81.73%	81.71%	82.35%	99.07%	0.00%	82.98%	82.38%	81.98%	81.95%	81.71%	82.48%	81.83%	99.19%	81.25%	82.82%	82.11%	82.31%	83.59%	100.00%

B

	Chr4LRK1	Chr4LRK2	Chr4LRK3	Chr4LRK4	Chr4LRK5	Chr4LRK6
Chr4LRK2	82.80%					
Chr4LRK3	81.99%	85.47%				
Chr4LRK4	81.48%	87.44%	85.33%			
Chr4LRK5	81.83%	84.97%	83.24%	85.44%		
Chr4LRK6	82.59%	84.27%	84.63%	84.64%	83.76%	
Chr8-LRK4	78.87%	77.36%	79.56%	78.20%	78.28%	82.55%
Chr8-LRK6	77.45%	79.62%	78.49%	78.13%	78.59%	78.90%
Chr8-LRK7	78.07%	79.50%	78.52%	78.52%	77.62%	77.27%
Chr8-LRK8	77.03%	78.16%	78.44%	77.19%	77.68%	78.38%
Chr8-LRK9a	80.04%	80.32%	79.54%	78.98%	79.39%	78.33%
Chr8-LRK9b	79.23%	80.45%	79.30%	79.69%	79.41%	79.77%

C

Indica	Remarque	taille contigue	Scaffold	Position	Nip-NB5	93-NB5	IR64 NB5	Nip-NB10	93-NB10	IR64 NB10 1	IR64 NB10 2	Nip-NB11	93-NB11a	93-NB11psb	93-NB11psa	IR64 NB11 4.5	IR64 NB11 3.5	IR64 NBips
Nip-NB5		3438	AP005442	Chr8:5 958 066..5 961 799				75.32%				74.49%						
93-NB5		10677	10292	Chr8:6 337 971..6 349 614	98.69%			75.80%	75.55%			73.79%	76.97%	74.80%	80.10%			
IR64 NB5			03M23		98.75%	98.58%		74.98%	75.76%	73.08%	76.23%	74.60%	74.51%	76.86%	74.73%	74.72%	74.69%	76.52%
Nip-NB10		3973	AP004565	Chr8:6 121 076..6 125 048	75.32%							85.07%						
93-NB10		9098	4897	Chr8:6 566 820..6 592 993	76.13%	75.55%		99.49%				84.95%	84.76%	84.23%	93.69%			
IR64 NB10 1	sequence incomplète		sequenzage		73.63%	73.63%	73.08%	99.74%	99.59%			84.89%	84.59%	88.50%	92.20%	88.54%	86.06%	89.60%
IR64 NB10 2	sequence incomplète		33B02		75.15%	77.25%	76.23%	89.90%	88.91%	88.50%		87.96%	87.96%	100.00%	0.00%	89.92%	87.97%	99.54%
Nip-NB11		3449	AP004565	Chr8:6 131 714..6 135 163	74.49%			85.07%				96.86%						
93-NB11a		9762	4897	Chr8:6 566 820..6 592 993	75.10%	76.97%		84.61%	84.76%			89.38%						
93-NB11psb	sequence incomplète	2414	17304	ChUnK:55 608 882..55 612 796	75.87%	74.80%		84.67%	84.23%			90.19%	89.38%					
93-NB11psa	sequence incomplète	4732	16744	ChUnK:45 350 073..45 354 804	75.00%	80.10%		94.01%	93.69%			92.75%	94.70%	0.00%				
IR64 NB11 4.5			44H23		75.26%	78.18%	74.72%	85.76%	85.69%	88.54%	89.92%	95.50%	94.89%	90.50%	93.71%			
IR64 NB11 3.5			44H23		75.24%	74.49%	74.69%	85.48%	85.40%	86.06%	87.97%	95.81%	96.22%	89.44%	93.36%	96.08%		
IR64 NBips	tronqué par CACTA		44H23		76.75%	75.36%	76.52%	87.49%	87.08%	89.60%	99.54%	90.98%	90.53%	99.61%	99.77%	91.58%	90.67%	

Pourcentage d'homologie de séquence entre les LRR-Kinase (A et B) et entre les NBS-LRR (C). Les comparaisons sont effectuées entre les paralogues au sein d'une variété et entre deux variétés par BLAST. A et C = Comparaison des LRR-Kinase au locus *Pi33*, B = Comparaison chez Nipponbare du cluster situé sur le chromosome 4 avec le cluster *Pi33*.

VII.9 Annexe 9 : Liste des amorces utilisées

VII.9.1 Amorces pour le génotypage de variétés sur l'ensemble du génome et au locus *Pi33*

Nom	Chromosome	Position (pb)	Forward	Reverse	Reference
RM495	1	213775	AATCCAAGGTGCAGAGATGG	CAACGATGACGAACACAACC	Temnykh *et al.,* **2001**
RM237	1	26795136	CAAATCCCGACTGCTGTCC	TGGGAAGAGAGCACTACAGC	Chen *et al.,* **1997**
RM507	5	71397	CTTAAGCTCCAGCCGAAATG	CTCACCCTCATCATCGCC	Temnykh *et al.,* **2001**
RM7057	8	5849947	TACGTCGTTGATCGATCGAG	GAGATCAGCAGGAATCATGC	McCouch *et al.,* **2002**
RMS*Pi33*-41	8	5915858	ATGCATGAGAGCAAACTAGCAA	CATCAGCCCATGTGTGTGTATT	Ballini *et al.,* **2007**
RMS*Pi33*-53	8	5945971	ACAGGATCTTTACCGGCATTTA	ACGCAAGGAGATTGTTGAGATT	Ballini *et al.,* **2007**
RMS*Pi33*-43	8	5967323	AATTGGTCGAGTTTTAACTGTG	GTCTTTAACCATAACTTACCCAAA	Ballini *et al.,* **2007**
RMS*Pi33*-44	8	6001276	CCTAGGGGTTCCTTGAGAGAAT	TTTCAAATTCAACCTACGCATTT	Ballini *et al.,* **2007**
RM3507	8	6152888	ACCCCTATCGATCAACCCTC	TTCGTTTGGTGTTAGGGGC	McCouch *et al.,* **2002**
RM3644	8	6199552	GAAGAGAGTGGGAGGATGGG	AATTTGTGTGCTCCTCCACC	McCouch *et al.,* **2002**
RM316	9	1022575	CTAGTTGGGCATACGATGGC	ACGCTTATATGTTACGTCAAC	Temnykh *et al.,* **2000**
RM474	10	1798783	AAGATGTACGGGTGGCATTC	TATGAGCTGGTGAGCAATGG	Temnykh *et al.,* **2001**
RM536	11	8963471	TCTCTCCTCTTGTTTGGCTC	ACACACCAACACGACCACAC	Temnykh *et al.,* **2001**
RM277	12	18286114	CGGTCAAATCATCACCTGAC	CAAGGCTTGCAAGGGAAG	Temnykh *et al.,* **2000**

VII.9.2 Amorces pour le génotypage de variétés sur l'ensemble du chromosome 8

Marqueur	Start	Stop	Forward	Reverse	Motif	Référence
RM5647	2886526	2886629	ACTCCGACTGCAGTTTTTGC	AACTTGGTCGTGGACAGTGC	(AAG)16	McCouch et al. 2002
RM3819	3009712	3009919	ACCTCACCTGTGGATCTTGG	CAATCCCCTTCTCTCCTTCC	(GA)20	McCouch et al. 2002
RM1376	3162526	3162725	CATGTGTGATGACTGACAGG	GGTGCTGTGATGATTCTTTC	(AG)31	McCouch et al. 2002
RM3231	3832787	3832935	AACACGAAGACCGGCCTC	CAGGTAGGAGCATGAGAGCC	(CT)12	McCouch et al. 2002
RM3572	3921984	3922127	AGTGCTGTCTGGTTTTTGGC	CCCCTCCCTTTCTTTCTTTG	(GA)12	McCouch et al. 2002
RM25	4372113	4372250	GGAAAGAATGATCTTTTCATGG	CTACCATCAAAACCAATGTTC	(GA)18	Temnykh et al.,2001
RM4085	4443929	4444061	ACGAAACTACTCATGTGTAA	CGAGTCTAGAATCCATATAA	(TA)13	McCouch et al. 2002
RM5556	4583162	4583263	ATCTCCCTCCCTCTCCTCAC	TCCACACCTTCACAGTTGAC	(TG)15	McCouch et al. 2002
RM3374	4725702	4725793	ATGAACTAGTGAACCCCCCC	GTAGCGGTAGCTGCAAAAGC	(CT)16	McCouch et al. 2002
RM1111	4767427	4767499	CCTCCTGTCGGATCTGGTAG	CTTATCCACTTGCCCTCTCG	(AG)12	McCouch et al. 2002
RM310	5110427	5110498	CCAAAACATTTAAAATATCATG	GCTTGTTGGTCATTACCATTC	(GT)19	Temnykh et al.,2000
RM547	5586078	5586272	TAGGTTGGCAGACCTTTTCG	GTCAAGATCATCCTCGTAGCG	(ATT)19	Temnykh et al.,2001
RM6208	5782678	5782820	TCGAGCAGTACGTGGATCTG	CACACGTACATCTGCAAGGG	(CGG)8	McCouch et al. 2002
RM7057	5849947	5850085	TACGTCGTTGATCGATCGAG	GAGATCAGCAGGAATCATGC	(AATT)11	McCouch et al. 2002
RMSPi33-41	5915858	5916016	ATGCATGAGAGCAAACTAGCAA	CATCAGCCCATGTGTGTGTATT		
RMSPi33-53	5945971	5946219	ACAGGATCTTTACCGGCATTTA	ACGCAAGGAGATTGTTGAGATT		
RMSPi33-43	5967323	5967561	AATTGGTCGAGTTTTAACTGTG	GTCTTTAACCATAACTTACCCAAA		
RMSPi33-44	6001276	6001511	CCTAGGGGTTCCTTGAGAGAAT	TTTCAAATTCAACCTACGCATTT		
RM3507	6152888	6152991	ACCCCTATCGATCAACCCTC	TTCGTTTGGTGTTAGGGGC	(CT)26	McCouch et al. 2002
RM3644	6199552	6199705	GAAGAGAGTGGGAGGATGGG	AATTTGTGTGCTCCTCCACC	(GA)14	McCouch et al. 2002
RM72	6757379	6757529	CCGGCGATAAAACAATGAG	GCATCGGTCCTAACTAAGGG	(TAT)5C(ATT)15	Temnykh et al.,2000
RMSPi33-6	7611627	7611946	GGCGTCTGTGGTACTTTGCT	CAGCAGCTCCGATTGTGTTA		
RMSPi33-17	7629498	7629705	ACTCCATAACAAATAAACGAAAGAA	TTTGATACCACAAATCAGCATCTT		
RMSPi33-30	7751951	7752563	ATGAACTTAACCCCATTCAGAAAAG	ATAAGGAAACAGCGATACAGAACAG		
RM6429	8379052	8379150	ACGACATGTCGATCAGCATG	ACCCTCTACGTACGTTCCCC	(GAG)9	McCouch et al. 2002
RM8243	8930096	8930264	CTCGTGCAACCATTATATTC	ACCTTAGCTGTCCTGAATTG	(CA)11	McCouch et al. 2002
RM6027	9105142	9105239	AAGCTCAACAGCTACCTCGG	CCCGTACACCACCGGAAAC	(CCG)8	McCouch et al. 2002
RM3481	9129811	9129998	CTCGTCGCGTTCGTCAAC	CATCTCATCACCTCACGTCG	(CT)22	McCouch et al. 2002
RM3395	10288488	10288546	ACCTCATGTCCAGGTGGAAG	AGATTAGTGCCATGGCAAGG	(CT)17	McCouch et al. 2002
RM5514	10401961	10402042	CTTCGAGCCCATACTCCATG	ACTCCGAACGTTACTCTCGC	(TG)12	McCouch et al. 2002
RM44	11752192	11752348	ACGGGCAATCCGAACAACC	TCGGGAAAACCTACCCTACC	(GA)16	Temnykh et al.,2001
RM483	11914878	11915195	CTTCCACCATAAAACCGGAG	ACACCGGTGATCTTGTAGCC	(AT)26	Temnykh et al.,2001
RM331	12288863	12289080	GAACCAGAGGACAAAAATGC	CATCATACATTTGCAGCCAG	[(CTT)4GTT]2(CTT)11	Temnykh et al.,2000
RM404	15307956	15308192	CCAATCATTAACCCCTGAGC	GCCTTCATGCTTCAGAAGAC	(GA)33	Temnykh et al.,2001
RM433	25691233	25691769	TGCGCTGAACTAAACACAGC	AGACAAACCTGGCCATTCAC	(AG)13	Temnykh et al.,2001
RM4154	28113079	28113230	AGAAGATCGATCGAAGAAAC	ATCATGAAACACAATAAGGC	(TA)14	McCouch et al. 2002

VII.9.3 Amorces pour le séquençage des gènes candidats

Primer	gène	position début	position fin	taille	Primer F	Primer R
LRK4-F1	Os08g10250	6559	7630	1071	GCCATAGGGTCCTCCAAGAT	GCATTGATTCCCACCAAACT
LRK4-F2	Os08g10250	7467	8461	994	GACGGCATTGCAGTATCTGT	GGTTTCGCCATTGTTGAAGT
LRK4-F3	Os08g10250	8097	9113	1016	GGAGCTACCATCAGCCTTGT	TCAGGCCACCATACAGAACA
LRK4-F	Os08g10250	8612	9697	1085	GCCAACTTTGTTTTACGGTTTC	GAGGCTGTTGTTTCCAAGAAAT
LRK4-F4	Os08g10250	9582	10644	1062	GGAAACAACAGCCTCTCTGG	GTCCATGTCGTGTTGTCTGG
LRK4-F5	Os08g10250	10532	11550	1018	GCCAGAACGTCATCCTCTTC	GAAGACATCTGGCCTTCCAA
LRK4-F6	Os08g10250	11321	12379	1058	ATGGCCGTGTTTAGTTCCAA	CCAGCGATTAATCACCGTCT
LRK4-F7	Os08g10250	12248	13294	1046	CGAAAATGTGTCACGGCTTA	GGACGGCCACCTACTGACTA
LRK4-F8	Os08g10250	13102	14137	1035	TGCGTTGTATGGACTTGATGA	GCTGGTTTTGATGTCCCTGT
LRK4-F9	Os08g10250	13962	15023	1061	TATGCACCACCAGCAAATTC	AAGGGCACAATGTTTGAAGG
LRK4-F10	Os08g10250	14923	15842	919	GTGAGTTTGCTGAGGGAAGG	TCACTTTGTGCGGTATCCAA
LRK4-F11	Os08g10250	15601	16502	901	CACGACATTTGCAACTACAACA	ACGTCGAGTAGGAGCGGAGT
NB5-F2	Os08g10260	31	952	921	AAACATTGCTGCAGCTTGAA	AGAGAGATTGATGCGCTGGT
NB5-F3	Os08g10260	727	1719	992	CAAGAACGAGGAAGCAGAGG	GGGGGAGTTCAGAGGAAGTT
NB5-F	Os08g10260	1329	2235	906	GGTCTGTTTTTCCAGAAAATGG	CCGGTTTTTCCCAAGTGTAATA
NB5-F4	Os08g10260	2065	2967	902	CTTCCGAGCCAAATATCCTG	CAATTGTTGGCTTTGGAGGT
NB5-F5	Os08g10260	2661	3654	993	TTGAAACCATATGAACCCTTGA	AGGAGAGCCGGTGAGCTAAG
LRK6-F1	Os08g10290	71	1118	1047	GACGACGCAGCAGAGAGAT	TGCGCTTTAACTACCCCAAA
LRK6-F3	Os08g10290	977	1888	911	TTTTGAAACGGAGGGAGTAA	GGTCGAAGCAAGAGGTTCAG
LRK6-F4	Os08g10290	1684	2671	987	GGGAGATGGGGAACGAAT	TCGAAGATCCGTGAGATTCC
LRK6-F5	Os08g10290	2476	3549	1073	TTGGGAAGCTTACTTTCATGC	ACATATTGCCCATGCAGATG
LRK6-F2	Os08g10290	3317	3549	232	GCAGGTGGGCATCAGATAAT	ACATATTGCCCATGCAGATG
LRK6-F6	Os08g10290	3366	4279	913	AGGGACCTTGACAAAGTTGG	CATCAGGGGGAAAATGTCAC
LRK6-F7	Os08g10290	4163	5156	993	TTGTAGGAGGTTCCAAGGAAAT	AACGCGTGTAACTTGTCAGG
LRK6-F8	Os08g10290	5019	6022	1003	ACAATCAACTCACGGGAAGC	CAAGGAAGTTTTTCGACACGA
LRK6-F9	Os08g10290	5803	6781	978	AGGAAGGCGAATTTTTGACA	CGATGTTGCACAGCTGAAAT
LRK6k-F	Os08g10290	6678	7659	981	CCTGATGGAAGAGTCATAGCTG	CAGATGACTCTCAAGGCTTCCT
LRK6-F10	Os08g10290	7426	8370	944	CACCGACAACTCTCGTGAAG	CGCGAGATCAAATGAGGATT
LRK7-F1	Os08g10300	57	1042	985	TCAGAGCGAGATAACGTGACA	TTTAACGGTCACCAACCACA
LRK7-F3	Os08g10300	767	2010	1243	CCTTTCTTGGCCGTTTACTG	TTCCGTCATCAAGACAGAGG
LRK7-F	Os08g10300	1784	2646	862	GTGACGATGAATTGAATTTGGA	TCAGGCTGATACCTCTGAAACA
LRK7-F4	Os08g10300	2464	3673	1209	ATCCCTTCCACGATTTCTCA	CGGATATCTTGCAGTTCCTCA
LRK7-F5	Os08g10300	3404	4489	1085	GCCACATTTGTCCCTTGACT	CCGAGGAAACAAGGAGTGTC
LRK7-F6	Os08g10300	4382	5411	1029	TTTTGACGTCACCTTCCTCA	CCCAGCAATTACACCAGCTT
LRK7-F2	Os08g10300	4836	5728	892	GTCACCATCGTCCCTGAGAT	GACGACTTGTGGGAACCACT
LRK7-F7	Os08g10300	5360	6647	1287	TGTGAGAAATGGAGTTCCAAAA	TTGGATGCAAAGACCATTGA
LRK7-F8	Os08g10300	6459	7079	620	CTTTTGAAGCGGCTATCTGG	TTTGCATTCACCTTCCATCA
LRK8-F1	Os08g10310	75	1165	1090	TACAGAGCCTCCCTTTGCAT	TTTTTAAACTGCCCGTGGTC
LRK8-F2	Os08g10310	1012	1931	919	CTCTTTGGCAGGGTTTACCA	CCCAAGGCAAATCAACAAGT
LRK8-F3	Os08g10310	1704	2778	1074	CCTCCCCTAGTGCACGATAA	CGAGCCTTTTGATCCACAAT
LRK8-F4	Os08g10310	2293	3474	1181	TGTTTGAAATTCATCGCTGCT	TGCAATTCCACTTGTCTTGTG
LRK8-F	Os08g10310	2924	3776	852	CCAATTTTTCTGGTCAACTTCC	CCAATGAAGAGCTCCCATTTAC
LRK8-F5	Os08g10310	3378	4558	1180	TTGGGAGCTTGTCTAATTTGG	TTTTTCCCTTGGAAACACAAA
LRK8-F6	Os08g10310	4359	5392	1033	GGGATAAGCCCTTCGCTAAC	TTTTCCACCAGCCATCTTTC
LRK8-F7	Os08g10310	5216	6215	999	TTGGCAAAGCTTAGGAAGGA	CGATGTTGCACAGCAGAAAT
LRK8-F8	Os08g10310	6101	7193	1092	AGGGTGTGCTACCTGATGGA	ACCTCTGCCACCTCAACATC
LRK8-F9	Os08g10310	6819	7734	915	CGGGGTGGTAGCACTAGAGA	GGCCATCCAAAATCGCTTA
LRK9a-F1	Os08g10320	13	1212	1199	CGCATAGTACGATGAATCAACAA	CAGCATCTAGGCAGAGCTGA
LRK9a-F	Os08g10320	952	1864	912	GACATGGACATGCTTGTTGG	CTGAGAAAACGGGCATTGTT
LRK9a-F2	Os08g10320	1685	2970	1285	AACTTACATATATAGGCACCTCAGTG	CTGCTCCAAGGTCTCCAGAT
LRK9a-F3	Os08g10320	2651	3566	915	CGATTCCGGAAAGTTTGTCT	GTTGTTTGCCACCAAATTCC
LRK9a-F4	Os08g10320	3448	4504	1056	GGCTACCCAGAACAACTTGC	TATTGCCCGTGCATTGTAAC
LRK9a-F5	Os08g10320	4272	5370	1098	GGTGGTGGTGGTTCTGCTAC	CATACCCTGCCAAAGGAAGA
LRK9a-F6	Os08g10320	5190	6141	951	TCTTGGGGAAGGTGGATATG	TTGCTTTCCTCGATGGAGTT
LRK9a-F7	Os08g10320	6018	6959	941	TGGCTCCTGAGTATGCAATG	TTCCTTTCGGAGGCTTAAAA
LRK9-F1	Os08g10330	-13	945	958	TGAGGTTTCTCTTGCCTTTTC	GGAATTGGTGTCCATGGTTT
LRK9-F2	Os08g10330	831	1921	1090	GCAGCTTAGAGATGGGTTGC	AAGGAGCAGTCGCACTTGAT
LRK9-F3	Os08g10330	1778	2828	1050	GAACACGATCCTGGGGAGAT	TGGAGAACAGGGTATGGTGA
LRK9-F4	Os08g10330	2624	3661	1037	TTGACTGTGATTTGGCTTCAA	TTTTCCAAATTGCCCAGTTC
LRK9-F5	Os08g10330	3523	4440	917	TCTTACAGAGGCGAATTTATGC	CGAGGAGCTCCCATTTAGAA
LRK9-F	Os08g10330	4276	5143	867	AGGTCCAATTCCAGCAAGTCTA	CAGTTGCAAATTGTTCCCAGTA
LRK9-F6	Os08g10330	5002	5992	990	CATGGCCACATGTTACTCCT	AGCTCACCCTATGCAAAACG
LRK9-F7	Os08g10330	5880	6834	954	GGGCGGAGAGTTTTTGACAT	TCCGATGTTGCACAGAAGAG
LRK9-F8	Os08g10330	6733	7830	1097	ATGGAAGGGTGGTAGCTGTG	ACCACATCACTCACCGGAAT
LRK9-F9	Os08g10330	7730	8191	461	CGTATGTCGTTCCTTTGCAC	TTCAATCGTGCGAATTCATC
NBLR10-F	Os08g10430	140	1126	986	GATTTGGGGGTCTTGGTAAAAC	CCATCCTTGGATCGAATTACTC
NBLR10-F2	Os08g10430	1005	2008	1003	CGTGTTGAAGATGTGGCTTG	ATTTCCAGCGTCTCCAAATG
NBLR10-F3	Os08g10430	1899	2990	1091	GCCATCAGACATCTGGTTCA	TTTGCTGTCGCAGAAATCAC
NBLR10-F4	Os08g10430	2817	3228	411	GAGCATGTTCTCAGGGAAGC	AGACCGGTGGAGTCAGTACG
NBLR11-F1	Os08g10440	59	1140	1081	TGGAATTCCTTTCATCCAAA	GCCAAGTATTGCACCTGACA
NBLR11-F2	Os08g10440	1035	2079	1044	TCAAGGAGTTCACTGGATTTG	CGTCACCTCCCGATCATAGT
NBLR11-F	Os08g10440	1899	2884	985	CGGCAATTATCCAGAGGACTAC	TGCGAGGAAATCTAGACAGTGA
NBLR11-F3	Os08g10440	2776	3628	852	CTGGGGTCTTCTGTTGGAAA	CAGTACGGTGCCACAGCTT

VII.9.4 Amorces utilisées pour les PCR long-range encadrant les gène NB11-3,5 et NB11-4,5

Amorce	Séquence	Position par rapport au gène NB11-3,5 (bp)
LPCR1F	AAATTCTTCCTACCAGACAGGTTCT	-415
LPCR2F	AGAATTTCTGTAAGTTTTTGGTTGG	-194
IR64-NB11F	CGCAGATGCTTAATTGCTTG	-174
LPCR2R	GCTTTAATGAAGGAAATCATACACG	117
IR64-NB11R	CAGTACGGTGCCACAGCTT	138
LPCR1R	AACAAGGGTATGTATTCTTTGTTGC	491

VII.9.5 Amorces pour l'analyse d'expression par Q-PCR au locus Pi33

Gène	Nom Amorce	Amorce F	Amorce R	Commentaire	Taille (bp)
LRK4	LRK4CDSF	ATCATTGGCATCCTTACC	CAGAATCATTGGCATATCC	Pas spécifique	278
NB5	NB5CDSF	ATCTTCCTCGTCATCTTAG	AATAACTCTTAGCAACTTCC	ok	155
LRK6	LRK6CDSF	GCCATCAATGTCCAGAGTC	CACCTTCCTTCGTCAATGC	ok	230
LRK7	LRK7CDSF	ATTGAGATGACTGAGATGG	GGTTATCGTTGGAGAAGG	Pas spécifique	164
LRK8	LRK8CDSF	GAGATGTTGAGGTGGCAGAGGTAG	GTGATTGTTGGTGATTGAGTGAGAGG	ok	162
LRK9a	LRK9aCDSF	CGAACACTAATAACTCCATC	GTCACCATCTCAACTACC	ok	243
NB10	NBLR10CDSF	GAGGTATCTTATCGTAGTTG	TCTGTGAATGTATTGATGG	ok	159
NB11	NBLR11CDSF	ATGGATGATGATGGTGGTGAG	TCTGGTTGGCAATCTGATGG	Pas spécifique	198
LRK9b	LRK9bCDSF	ATGGCTTCTTGTGGCTGATGC	GCTCGCCGCTGATGTTCC	Pas spécifique	155
LRK4	LRK4F2	CGAATTTAGGAGAGGCATCATAC	CGTTCTGGCTGTCTGGAATAG	Pas spécifique	160
LRK7	LRK7F2	GGTCCTGGCAATTCTTACTGG	GCTGGTGTTCCCTCCTCTG	Echec optimisation	96
LRK9b	LRK9bF2	GCGAAGCCGAACTACATCATTG	TGTCTCCCTCTGCCCACTG	Pas spécifique	110
NB5	NB5F2	TGGCATTGAGCACCTACTG	CTATGAGGCTACCACTTCGG	ok	181
NB11	NBLR11F2	TCTGGTGACAGCCTGATGG	TCTGGGAACTCGGGAGAGG	ok	92
LRK7	QLRK7F	TAGAGAGCAGAGGGAGACTTC	AGGATGACTTGGTTATGAGTATGG	Pas spécifique	199
LRK9b	QLRK9bF	AATAGCAGCCATGTCACCAC	GCAACTTCGCATTCATCTTCC	Pas spécifique	137
NB10	QNB10F	CGTAATTGATTGATCCTCTGTCTG	GCTGGCTATGATAATGTATTGTCC	ok	159
NB11	QNB11F	ACAGCAGCAATAAGGTTCGC	TGAGCCAAGTGAGCAGGAG	Pas spécifique	102
LRK4	QLRK4F	ACCTGCTTCTCCAGATGATTCCTC	GATGCCTCTCCTAAATTCGTGTCG	Pas spécifique	113

VII.9.6 Amorce pour criblage par Tilling sur les mutants IR64

Gène	Nom Amorce	Séquence F	Séquence R	Taille (bp)
64-NB11-4,5	Pi33_1	ATGATAAGATCGGGCAGCAA	GCAAATCCATGAATGCCATA	561
Nip-NB11	Pi33_2	TGGTAAAACAACACTTGCCAAA	AAGTAATGCGGTGCCAAAAA	501
64-NB11-3,5	Pi33_3	CATGTCAAGTCCCCTGATGA	GTGGCAAACCTCCACACTTT	533

VII.9.7 Amorces pour séquençage des mutants C101LAC

Name	Sequence	Taille
Pi33_1_F	CTGGGGTCTTCTGTTGGAAA	852
Pi33_2_F	GCGAGCAGACCAATCTAAGG	542
Pi33_3_F	CGGCAAATATCCAGAGGACTAC	985
Pi33_4_F	TGTGGAAACAAGAAGCATGG	740
Pi33_5_F	TGGAGTTCACTGGATTTGTTA	1044
Pi33_6_F	CATGTCAAGTCCCCTGATGA	533
Pi33_7_F	ATGATAAGATTGGACAACAA	561
Pi33_8_F	ATCCAAACAGGCTCCATCTG	1081
Pi33_1_R	CAGTACGGTGCCACAGCTT	852
Pi33_2_R	TATCGATGCCCAACTCACAA	542
Pi33_3_R	TGCGAGGAAATCTAGACAGTGA	985
Pi33_4_R	GCCCAGCGATGGACACGTAG	740
Pi33_5_R	CGTCACCTCCCAATAACGGT	1044
Pi33_6_R	GCGGCAAACCTCCACACTTT	533
Pi33_7_R	GCAAATCCATGAATGCCATA	561
Pi33_8_R	GCCAAGTATTGCACTGGACA	1081

VII.9.8 Amorce pour la validation par RT-PCR Quantitative des gènes de puces

N° TIGR	Amorce	Sequence F	Sequence R	Annotation TIGR
Os02g48210	qq38384	ACCATCCTGCAGATCCTGAC	CCTGGTAGTTCTGGGTCCAA	Protéine kinase
Os06g09260	qq31286	GCCATATGCCGAGTTCCTC	CGAATGCAACACTCAAGAACA	Protéine hypothétique
Os12g30580	qq32669	CCTCGTCTTCACACCACCTC	CGGCCAACCTACTCCAGATA	Protéine hypothétique
Os12g36850	qq29491	CATGTTACTGTGGCGTGGTC	CATGTTACTGTGGCGTGGTC	Protéine PR
Os06g21110	q1220	TCGTCGTGGCGGCGTCTC	GGTGTTTGGGCTTGGTGTTTATGG	Protéine hypothétique
Os08g31860	qq24233	TCCCACGTCAACAAGATCAA	CGCATGCATACAACATAATCA	Protéine hypothétique
Os09g23550	q16761	CGGCGAGCACGGCATCAC	CGACACAAGCAAGCAAGCAAGC	Sinapyl alcohol dehydrogénase
Os08g42210	qq34084	GCATCAGCAAGGAAGGAGAA	GAGAGGCAAATCCCATACCA	Transporteur de cation
Os02g10600	qq38094	GGACGGTTTGCTACGTTGAT	GAGGATTGCACAACTGCTGA	Protéine à domaine F box
Os05g06500	qq20841	CAGCCGATGGTTGATCCTAT	TCAGGCTCAGAGAGTGCAAG	Protéine de stress (USP)
Os05g15770	qq02100	CTGGATTCATGCACGAGCTA	CCGTCCTGATCACCTCACTT	Inhibiteur de xylanase
Os06g09560	qq26143	GATCAGCCGAAGCAACGTA	ACACCGTGTGTTCAACCAAA	Domaine DnaJ
Os11g02369	qq58391	ACATCGCAGGCCGTACAT	ATGCATCGATCTAGCAGCAA	Transporteur de lipide
Os12g19394	q2074	CACCTCCGTTGCTCCCTTC	ATCCTTCCACCGTTGCTGAC	Ribulose bisphosphate carboxylase
Os01g62890	qq09114	ATTGCATCATTGTGGAGCTG	CATGTGGTGGGGGACTAGAA	Protéine de type PRA1
Os02g42450	q594	GCGACGGCAAGTTCCACAAG	TTGGCGAGCACGGACCTG	Protéine hypothétique
Os04g01330	qq25777	TTTTCCTGGGATGATTTTCG	CCTGTCATCAGATGGAATGGA	Protéine hypothétique
Os04g08630	qq26166	CCGGAGATGAAGAAGATGGA	TGCAATGCAACATCAAATCA	Protéine hypothétique
Os07g01960	q39611	GGCTTGTGGCTGCGTATG	TCCCTGTGACTGCGAACC	Protéine hypothétique
Os10g14870	q15792	GCGTATAAGCAGGACAGAAGGTG	CGGCGGTAGCGGGTATGG	Domaine heavy metal-associated
Os11g40674	qq26193	GGTCGGTTGAGTTTTGGTTG	GCTAGGCTCTTGGGTGTCTG	Protéine hypothétique

VII.10 Annexe 10 : Amplification par PCR

PCR Long-range

Le mélange contient 100 ng d'ADN , 100mM d'Amorce, Tampon, MgCl2 1mM, dNTP 0,1 mM, Taq polymerase.

Le cycle est :

5 min 95°c

15 sec 95°c
30 sec 50°c } x 10 cycles

4 min 30 sec 68°c

15 sec 95°c
30 sec 50°c } x 20 cycles

4 min 30 sec 68°c + 20s chaque cycle

10 min 72°c

PCR classique

Le mélange est le même mais pour 4ng d'ADN.

Le cycle est :

5 min 95°c

30 sec 95°c
30 sec 62°c } x 35 cycles
30 sec 72°c

5 min 72°c

VII.11 Annexe 11 : Criblage des banques BAC

VII.11.1 Banques BAC disponibles

N° IRGC	Espèce	Genome	Code Banque BAC	Taille du génome (Mbp)	Taille moyenne insert (Kb)	Nb de clones	Origine	Source ADN	Commentaires
105491	*O. rufipogon*	AA	OR_CBa	439	133	64512	Malaysie	S. Mc Couch	Variété pérenne
100897	*O. nivara*	AA	OR_BBa	448	161	55296	Inde	N. Kurata	Variété annuelle
96717	*O. glaberrima*	AA	OG_BBa	354	130	55296	Afrique	IRRI	Variété Cg14
105690	*O. punctata*	BB	OP_Ba	423	141	36864	Afrique	IRRI	
105143	*O. alta*	CCDD	OA_BBa	1000	132	92160	Amérique du sud	IRRI	
101232	*O. brachyantha*	FF	OB_Ba	338	130	36864	Afrique	IRRI	
104502	*O. coarctata*	HHKK	OC_Ba	1283	122	147456	Bangladesh	IRRI	

VII.11.2 Clones BAC séquencés ou en cours de séquençage

Clone BAC	Espèce	Variété	Génome	Taille	Banque BAC	Références
03M23	*O. sativa* indica	IR64	AA	100 kb	OSIIBb, IRRI	Yang et al., 1997
33B02	*O. sativa* indica	IR64	AA	60 kb	OSIIBb, IRRI	Yang et al., 1997
44H23	*O. sativa* indica	IR64	AA	100 kb	OSIIBb, IRRI	Yang et al., 1997
30F11	*O. sativa* indica	IR64	AA	100 kb	OSIIBb, IRRI	Yang et al., 1997
31M18	*O. sativa* indica	IR64	AA	80 kb	OSIIBb, IRRI	Yang et al., 1997
48F02	*O. sativa* indica	IR64	AA	80 kb	OSIIBb, IRRI	Yang et al., 1997
K0402B02	*O. sativa* indica	Kasalath	AA	110 kb	Kasalath BAC library, NIAS DNA Bank	Katagiri et al., 2004
K0090G08	*O. sativa* indica	Kasalath	AA	150 kb	Kasalath BAC library, NIAS DNA Bank	Katagiri et al., 2004
OG 05D12	*O. glaberrima*	IRGC 96717	AA	70 kb	OG_Bba, OMAP	Ammiraju et al., 2006
OR 73D01	*O. rufipogon*	IRGC	AA	140 kb	OR_Cba, OMAP	Ammiraju et al., 2006
OP 72E21	*O. punctata*	IRGC	BB	150 kb	OP_Ba, OMAP	Ammiraju et al., 2006
OB 74I24	*O. brachyanta*	IRGC	FF	190 kb	OB_Ba, OMAP	Ammiraju et al., 2006

VII.11.3 Criblage par hybridation

a <u>Préparation de la sonde</u>

La sonde est préparée à partir du kit « prime-a-gene labelling system » de PROMEGA. Une PCR est faite à partir de l'ADN d'IR64 selon le protocole normal (Annexe 10). 25 à 50 ng de cette PCR est dénaturé dans 15µL d'H2O à 95°c pendant 5 à 10 min. Puis, on ajoute 8µL de mix d'hybridation : dNTP (0.5 mM absence de dCTP, sera radioactif, ajouté en salle radiocompétente), Tampon (5X), BSA (10X), DNA polI largeklenow fragment.

En salle de radioactivité, prélever 2 µL de solution radioactive P32 et ajouter à la préparation. Mélanger par inversion 3-4 fois. La sonde est incubée 1h00 à température ambiante.

b <u>Pré-hybridation et hybridation des membranes</u>

La membrane est imbibée de solution Church à 65°c puis est enroulée dans un tube à hybridation. 10 ml de Church 65°c sont alors ajoutés. Les différents tubes sont installés de manière équilibrée dans le four pendant 30 min à 1h00.

Après incubation de la sonde, ajouter 25 µl H_2O pour faciliter le transfert. Puis dénaturer 5 min à 95°c, puis laisser sur glace 2 min. Sortir les tubes du four et ajouter les 50 µL de sonde. Replacer les tubes au four à 65°c pour la nuit.

c Lavage des membranes

Sortir les tubes du four, verser le contenu liquide dans la poubelle adéquate. Ajouter 30 ml de tampon de lavage 1 puis replacer les tubes 10 min au four à 65°c. Jeter le tampon de lavage dans la poubelle adéquate. Ajouter 30 ml du tampon de lavage 2 puis replacer les tubes 10 min au four à 65°c. Jeter le tampon de lavage. Sortir la membrane du tube. Entourer la membrane de film plastique Saran, puis placer rapidement la membrane dans une cassette avec écran. Sous lumière rouge placer un film dans la cassette. La cassette est laissée à –80°c pendant 1 à 3 jours avant de révéler le film.

d Composition des Tampons

Tampon Church, composition pour 500 mL pH 7.4 :

SDS 20%	175 mL	7%
Sodium Phosphate	22.25 g	0.25M
EDTA	2 mL	2mM

Première solution de lavage :
SSC 1 + SDS 0,1 %

Seconde solution de lavage :
SSC 0,4 + SDS 0,08 %

VII.11.4 Criblage par PCR

Une PCR est pratiquée sur un Pool de 24 colonies (Taq polymerase maison 0.1, Tampon 10X, MgCl2 2,5 nM , dNTP 0,5 nM, Primer 0,5 nM, colorant 0.5 µL). Le mix est préparé pour une plaque de 384 puits plus 8 puits de témoin IR64. La révélation se fait sur un gel d'agarose 3% TAE avec une migration 1h30 à 130V. Pour les Pool qui donnent un résultat positif une deuxième PCR sur colonie isolée permet d'identifier laquelle des 24 colonies a été amplifiée.

Le cycle est un cycle en Touchdown :

94°C	4 min	
94°C	30s	10 cycles avec -1°C pour chaque cycle
60°C	30s	
72°C	40s	
90°C	30s	30 cycles
50°C	30s	
72°C	40s	
72°C	15 min	
10°C	10 min	

VII.11.5 Amorces pour criblage de la banque BAC IR64

Gène ou clone BAC	Amorce	Séquence Amorce forward	Séquence Amorce reverse	Commentaire
44H23	N1F	CCCTCTCCAAATTGAGTAGCA	GGATGTCAAAAGGTGGGAGA	PCR
44H23	N2F	AGGCGCACTTGCATCAAT	ATGCCCCTATGAACACCTTG	PCR
44H23	N3F	TGCTTATCCCATCATTCAATTTT	GCATTTTCAGGGATTTTAGCC	PCR
Os08g10260	NB5	GGTCTGTTTTTCCAGAAAATGG	CCGGTTTTTCCCAAGTGTAATA	PCR + Sonde
Os08g10300	LRK7	GTGACGATGAATTGAATTTGGA	TCAGGCTGATACCTCTGAAACA	PCR + Sonde
Os08g10310	LRK8	CCAATTTTTCTGGTCAACTTCC	CCAATGAAGAGCTCCCATTTAC	PCR + Sonde
Os08g10330	LRK9	AGGTCCAATTCCAGCAAGTCTA	CAGTTGCAAATTGTTCCCAGTA	PCR
Os08g10430	NB10	GATTTGGGGGTCTTGGTAAAAC	CCATCCTTGGATCGAATTACTC	PCR + Sonde
Os08g10440	NB11	CGGCAATTATCCAGAGGACTAC	TGCGAGGAAATCTAGACAGTGA	PCR + Sonde

VII.12 Annexe 12 : Transformation des bactéries

VII.12.1 Transformation bactérienne par choc thermique

Les tubes contenant 50µL de cellules compétentes DH5α ou DH10b sont décongelés dans la glace et 2µL d'ADN sont ajoutés par tube. Après une incubation de 30 min dans la glace, les cellules sont soumises à un choc thermique : 45 secondes à 42°C, puis refroidis rapidement deux minutes dans la glace.

Les bactéries sont alors mises 1h à 37°C sous agitation dans 1 mL de milieu SOC afin de permettre l'expression phénotypique des plasmides au sein des bactéries transformées. 200 µL de bactéries sont ensuite étalés sur milieu solide LB + antibiotique adapté + X-Gal (16µg/mL) si nécessaire. Avec l'utilisation du X-Gal, les colonies transformées génèrent des colonies blanches après 24h d'incubation à 37°C.

VII.12.2 Transformation bactérienne par électroporation

Les tubes contenant 20µL de cellules compétentes EHA105 sont mis à décongeler sur la glace et 1 µL d'ADN (20 à 60 ng) est ajouté. La préparation est déposée entre les électrodes. Les conditions de l'électroporation sont : 330 µF, Fast, 400V, 4kΩ.

Après le tir ajouter 1 mL de LB puis laisser à l'agitation à 28°C pendant 1 à 2h. Ensuite, la suspension est étalée sur boite avec l'antibiotique adapté et mise en culture 3 jours.

VII.13 Annexe 13 : Extraction d'ADN plasmidique

VII.13.1 Milieu de culture

Les cellules sont mises en culture à 37°C dans un milieu LB (Bactotryptone 10 g/L, Extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, Agar 20 g/L seulement pour LB solide). Pour les clones BAC l'antibiotique ajouté est le Chloramphénicol (12,5 µg/mL), pour les vecteurs pTAC37 et pCAMBIA l'antibiotique ajouté est la Kanamycine (25 µg/mL).

VII.13.2 Extraction d'ADN plasmidique des clones BAC

Les ADN sont extraits suivant le protocole fourni avec le kit d'extraction Nucleobond® AX de Macherey-Nagel. Préparer 30 ml de culture BAC dans du milieu LB chloramphénicol (125 µg/ml). Laisser toute la nuit à 37°C. Centrifuger la culture à 3 000 rpm, 20°C, 20 minutes. Jeter le surnageant, resuspendre le culot dans 400 µL de tampon S1.

Ajouter 400 µL de S2 et mélanger par inversion. Incuber 2-3 minutes à température ambiante. Ce mélange lyse les bactéries. Ajouter 400 µL de tampon S3 et incuber sur glace pendant 5 minutes. Centrifuger à 4°C, 15 minutes à 13 000 rpm. Récupérer le surnageant et le transférer sur une colonne (écoulement par gravité). Nettoyer la colonne deux fois avec 1,5 mL de tampon N3 en jetant la solution du tube collecteur. Eluer l'ADN plasmidique avec 1 mL de tampon N5. Ajouter 750 µL d'isopropanol et centrifuger à 4°C, 30 minutes à 13 000 rpm. Ajouter 500 µL d'éthanol à 70% et centrifuger à 4°C, 10 minutes à 13 000 rpm. Eliminer le surnageant et laisser les tubes sécher sous la sorbonne. Resuspendre le culot dans 30 µL d'H_2O ultra pure.

Composition des tampons :

S1 : 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/ml, pH 8.0

S2 : 200 mM NaOH, 1% SDS

S3 : 2.80 M KAc, pH 5.1

N1 : 100 mM Tris/H_3PO_4, 15% ethanol, 400 mM KCl, pH 6.3

N3 : 100 mM Tris/H_3PO_4, 15% ethanol, 1150 mM KCl, pH 6.3

N5 : 100 mM Tris/H_3PO_4, 15% ethanol, 1000 mM KCl, pH 8.5

VII.13.3 Extraction d'ADN de vecteur

Les ADN sont extraits suivant le protocole fourni avec le kit d'extraction Wizard® Plus SV Miniprep de Promega. A partir d'un stock à –80°C, préparer une culture de clone BAC de 2 mL de milieu LB et kanamycine. Incuber toute la nuit à 37°C. Transvaser dans des tubes de 1,5 mL

et centrifuger à 21°C, 10 minutes à 13 000 rpm. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 250 µL de Tampon de resuspension. Ajouter 250 µL de tampon de lyse et incuber sur paillasse pendant 5 minutes. Ajouter 10 µL de Protéase Alkaline et mélanger avec la pipette. Incuber pendant 5 minutes sur paillasse. Ajouter 350 µL de tampon de neutralisation et centrifuger à 21°C, 10 minutes à 13 000 rpm.

Transférer le surnageant sur une colonne avec son tube collecteur. Centrifuger 1 minute à 13 000 rpm. Pré-laver la colonne avec 750 µL de solution de lavage et centrifuger 1 minute à 13 000 rpm. Laver la colonne avec 250 µL Solution de lavage et centrifuger 2 minutes à 13 000 rpm.

Transférer la colonne sur un tube propre de 1,5 mL. Déposer 50 µL d'H_2O pure et laisser agir 15 minutes. Centrifuger 1 minute à 13 000 rpm. Jeter la colonne.

VII.14 Annexe 14 : Clonage

VII.14.1 Digestion

ADN	2 µL
Enzyme	2 µL
Tampon de digestion	2 µL
BSA	1 µL
H_2O	q.s.p 20 µL

Incubation deux heures à 24°C pour SmaI et 37°C pour XmaI, NotI, BamHI.
Pour le vecteur, 1µL d'APex™ Heat-labile Alkaline Phosphatase d'Epicentre est rajouté 10 minutes avant la fin de la digestion.
L'enzyme est inactivé à 65°C (60°C pour SmaI) pendant 15 minutes.

VII.14.2 Purification Phénol / Chloroforme

Ajouter 1 volume de phénol (pipeter dans le fond de la bouteille). Vortexer. Centrifuger 5 minutes à 13 000 rpm. Récupérer la partie haute du surnageant sans toucher celle en dessous et la mettre dans un nouveau tube. Sous sorbonne, ajouter 1 volume de chloroforme. Vortexer. Centrifuger 5 minutes à 13 000 rpm. Récupérer la partie haute du surnageant sans toucher celle en dessous et la mettre dans un nouveau tube. Répéter cette opération une fois. Ajouter 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M pH 5.2. Ajouter 2 volumes d'Ethanol absolu froid. Vortexer. Centrifuger 20 minutes à 13 000 rpm. Enlever tout le surnageant (quitte à recentrifuger). Ajouter 500 µL d'Ethanol à 70%. Vortexer. Centrifuger 20 minutes à 13 000 rpm. Enlever tout le surnageant. Laisser le tube sécher. Resuspendre le culot dans 100 µL d'eau.

VII.14.3 Ligation

La ligation est réalisée dans le mélange réactionnel suivant qui est incubé une nuit à 17°C : ADN (30 à100 ng), Vecteur pCAMBIA 5300 (100 ng/µL), Tampon de ligation (2X), Ligase phage T4 (3Unité).

VII.14.4 Vérification des clones

Trois méthodes ont été utilisées pour confirmer la présence d'un insert dans le plasmide recombinant.

(1) Libération de l'insert par l'enzyme utilisée lors de la digestion. Deux bandes sont attendues : l'insert et le vecteur. Mais le site de coupure de l'enzyme a pu être dégradé lors de la ligation donc la digestion peut ne pas fonctionner.

(2) Libération de l'insert par une autre enzyme présente dans le site multiple de clonage du vecteur. Nous avons utilisé l'enzyme EcoRI pour pCAMBIA 5300. L'insert pouvant être coupé à différents endroits, les profils de digestion sont plus complexes et, donc, potentiellement plus difficile à interpréter.

(3) Une PCR avec des couples d'amorces amplifiant différentes zones des clones BAC étudiés a été effectué pour vérifier quelle zone des clones BAC a été clonée.

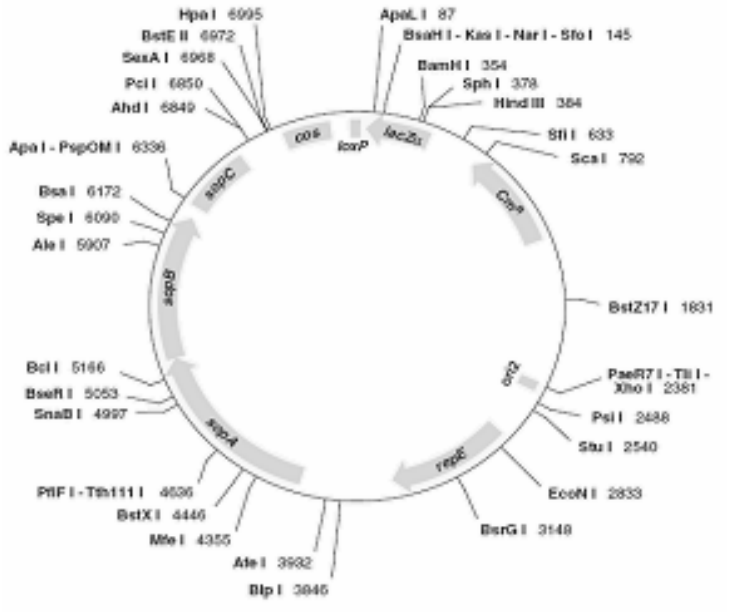
(4) Une fois toutes ces étapes réalisées, les extrémités de l'insert sont séquencées par la société GATC Biotech après amplification par des amorces placées de part et d'autre du site d'insertion (amorces universelles M13, Annexe 4). Ces séquences peuvent être comparées aux séquences des clones BAC 33B02 et 44H23 dont nous disposons.

VII.14.5 Amorces pour vérification du clonage

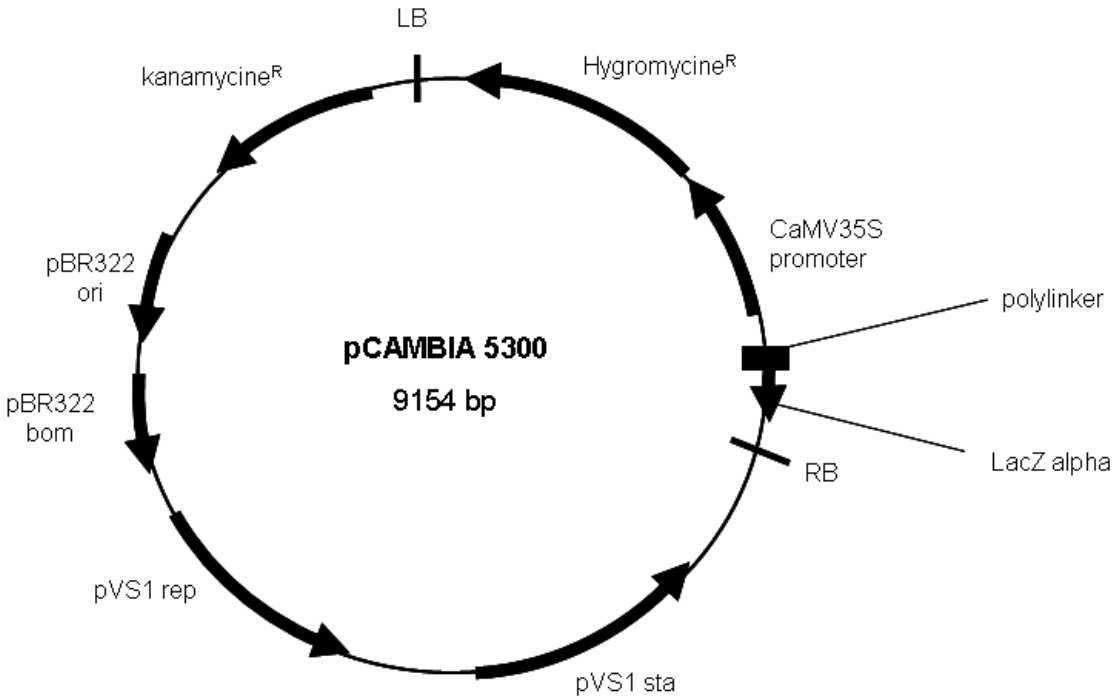
Gène ciblé	Nom des amorces	séquences forward	séquences reverses	Taille des fragments attendues
BAC 33B02 et 44H23	IR64N1	CCCTCTCCAAATTGAGTAGCA	GGATGTCAAAAGGTGGGAGA	270 pb
	IR64N2	AGGCGCACTTGCATCAAT	ATGCCCCTATGAACACCTTG	290 pb
	IR64N3	TGCTTATCCCATCATTTCAATT	GCATTTTCAGGGATTTTAGCC	124 pb
BAC 33B02	IR64N4	CCCGTTTCGATCAAACAACT	TCATTGGAGGAAGGAACGAG	194 pb
BAC 44H23	IR64N5	GATCCTCTCCCCTTCCAGTC	GCCACACTCAAAAACAAGCA	183 pb
BAC 44H23	IR64N6	GACACGTGAACCCAGAACCT	TAATGCATGTCGAGCTTTCG	201 pb
BAC 33B02	IR64N7	AATAATTGCAAGCGGCAAAC	CTGGGCATGTAGGAACCATC	175 pb

VII.15 Annexe 15 : Carte de restrictions des vecteurs

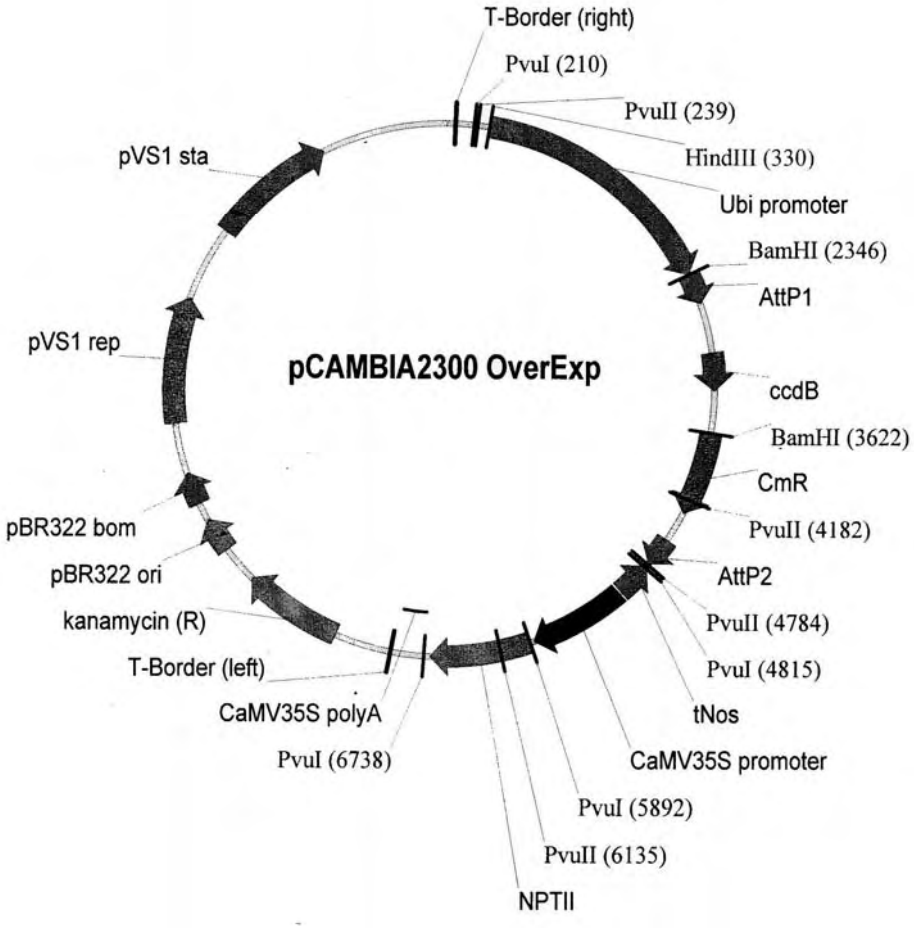
VII.15.1 pBeloBAC 11 (7.5 kb)



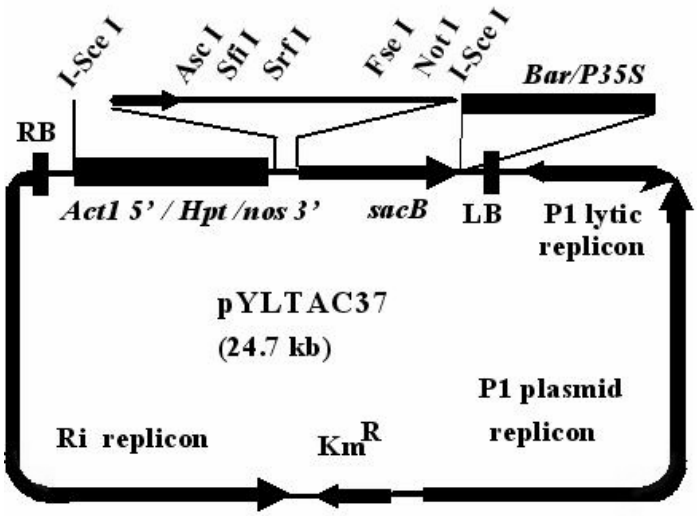
VII.15.2 pCAMBIA 5300 (9.8 kb)



VII.15.3 pCAMBIA2300 OverExp (11,2 kb)



VII.15.4 pTAC37 (24,7 kb)



Résumé:

La résistance des plantes aux agents pathogènes peut être décomposée en plusieurs étapes : reconnaissance, régulation, réaction de défense. La reconnaissance spécifique d'un agent pathogène suit souvent la théorie gène-pour-gène, où un gène de résistance dominant permet à la plante de détecter les souches de l'agent pathogène portant le gène d'avirulence correspondant. En l'absence de l'un des deux interactants, la maladie se développe. Au cours de cette thèse, une revue de la littérature à permis de mettre en évidence que 85 gènes et 347 QTLs de résistance à *Magnaporthe oryzae* ont d'ores et déjà été cartographiés, dont certains finement. Le produit du gène d'avirulence *ACE1* de *M. oryzae* présente l'originalité de ne pas être sécrété. En conséquence, il se peut que le gène de résistance correspondant, *Pi33*, révèle un mécanisme de résistance différent de ceux déjà connus.

Au cours de cette thèse, la présence du gène de résistance *Pi33*, a été mise en évidence à une fréquence élevée dans les riz cultivés de type indica. L'utilisation de couples de souches isogéniques a également permis de mettre en évidence *Pi33* chez des espèces de riz sauvages (*Oryza rufipogon* et *O. latifolia*) relativement éloignées génétiquement du riz cultivé. Ces résultats sont en faveur d'une origine ancienne de *Pi33*. Par ailleurs, l'introgression de *Pi33* dans la variété IR64 à partir d'une accession de l'espèce sauvage *O. rufipogon* a été caractérisée.

D'autre part, une cartographie physique du locus de *Pi33* a été réalisée dans une variété résistante (IR64). Une séquence partielle de cette zone a été obtenue et comparée aux séquences disponibles pour les deux variétés sensibles déjà séquencées (Nipponbare et 93-11). L'étude comparée des séquences de ce locus a mis en évidence des ruptures de la micro-synténie et confirme ainsi une évolution complexe du cluster. Ainsi, trois gènes candidats de type Nucleotide-Binding Site/Leucine Rich Repeat (NBS-LRR) ont été identifiés chez la variété sensible Nipponbare contre sept chez la variété résistante IR64. Le polymorphisme et l'expression des différents gènes candidats ont été caractérisés chez différentes variétés résistantes et sensibles. Cette approche a permis de cibler trois des NBS-LRR comme les candidats possibles pour *Pi33*. Différentes stratégies de clonage ont également été initiées (recherche de mutants, complémentation), ce qui a permis entre autre l'identification de 20 lignées mutées dans *Pi33* pour lesquelles une caractérisation fonctionnelle de *Pi33* est envisagée.

Enfin, l'originalité de l'interaction *ACE1*/*Pi33* pourrait se traduire par une originalité des voies de régulation et des réactions de défense. Des analyses d'expression de gènes marqueurs des réactions de défense ont été réalisées sur des échantillons de feuilles infectés par *M. oryzae*. L'expression de ces gènes a ainsi été comparée entre différentes interactions incompatibles et compatibles faisant intervenir ou non *Pi33*. Ces résultats semblent indiquer que même au sein de fonds génétiques différents, *Pi33* entraînerait un profil d'expression conservé des gènes de défense.

Mots-clefs : riz, Pyriculariose, *Pi33*, *ACE1*, résistance, cartographie physique, NBS-LRR, clonage, gènes de défense.

Rice-*Magnaporthe oryzae* interactions. Origin, characterization and evolution of *Pi33* cluster of rice blast resistance genes.

Summary:

The interaction between plants and pathogens can be summarized in three steps: recognition, regulation, defence response. The specific recognition of the pathogen follows the gene-for-gene theory, where a resistance gene of the plant can detect strains of the pathogen with the corresponding avirulence gene. During this PhD, a review of the literature allowed to show that 85 genes and 347 QTLs of resistance to *Magnaporthe oryzae* have already been mapped. The product of the avirulence gene *ACE1* of *M. oryzae* is original because it is not secreted. Consequently, the resistance gene corresponding to *ACE1*, *Pi33*, could reveal a resistance mechanism different from those already known.

During this work, the presence of the resistance gene *Pi33* was detected at a high frequency in the domesticated rice subspecies indica. Using couples of isogenic strains, *Pi33* was also identified in some accessions of wild rice species (*Oryza rufipogon* and *O. latifolia*). These results suggest an ancient origin of *Pi33*. Moreover, we characterized the introgression of *Pi33* from an accession of the wild species *O. rufipogon* in the variety IR64.

In addition, we constructed a physical map of the *Pi33* locus in the resistant variety IR64. A partial sequence of the locus in this resistant variety was obtained and compared with the sequence of two susceptible varieties (Nipponbare and 93-11). The comparative study of these sequences revealed a poor conservation of the micro-synteny and confirmed a complex evolution of the locus. Three Nucleotide-Binding Site/Leucine Rich Repeat like (NBS-LRR) candidate genes were identified in the susceptible variety Nipponbare and seven in the resistant variety IR64. Sequence polymorphism and level of expression of various candidate genes was characterized in different resistant and susceptible varieties. Although this approach did not allow identifying *Pi33*, the identification of 20 mutant lines for *Pi33* will allow a functional analysis of the gene. Cloning *Pi33* was attempted by different approaches (mutants, complementation). This work is still in progress.

Finally, because the originality of the interaction *ACE1*/*Pi33* could result in an original regulation pathway, we performed transcription analyses on samples of leaves infected by *M. oryzae*. The expression of marker genes was compared between different incompatible and compatible interactions involving *Pi33* or not. These results suggest that even within different genetic backgrounds, *Pi33* contributes to a conserved defence pathway.

Key Words: rice, *Magnaporthe oryzae*, *Pi33*, *ACE1*, resistance gene, physical mapping, cloning, defence gene.