



**HAL**  
open science

# Caractérisation des *Xanthomonas oryzae* au Mali et déterminisme génétique de la résistance du riz au flétrissement bactérien et à la strie foliaire

Cheick Tekete

► **To cite this version:**

Cheick Tekete. Caractérisation des *Xanthomonas oryzae* au Mali et déterminisme génétique de la résistance du riz au flétrissement bactérien et à la strie foliaire. Biologie végétale. Université Montpellier; Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (Mali), 2019. Français. NNT : 2019MONTG059 . tel-02612221

**HAL Id: tel-02612221**

**<https://theses.hal.science/tel-02612221>**

Submitted on 19 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie des Interactions

École doctorale GAIA

Unité de recherche IPME

En partenariat international avec  
l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali

## Caractérisation des *Xanthomonas oryzae* au Mali et déterminisme génétique de la résistance du riz au flétrissement bactérien et à la strie foliaire

Présentée par Cheick TEKETE

Le 27 Novembre 2019

Sous la direction de Valérie VERDIER  
et Ousmane KOITA

Devant le jury composé de

Haby SANOU, Directrice de Recherche, CRRA, IER

Tristan BOUREAU, Maitre de Conférence, Université d'Angers

Véronique JORGE, Chargée de recherche, INRA

Soungalo SARRA, Directeur de Recherche, CRRA, IER

Michel LEBRUN, Professeur, Université de Montpellier

Sébastien CUNNAC, Chargé de Recherche, IRD

Ousmane KOITA, Professeur, Faculté de pharmacie, Université de Bamako

Valérie VERDIER, Directrice de Recherche, IRD

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Président du jury

Invité

Co-directeur de Thèse

Directrice de Thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

## Résumé :

Au Mali, la production rizicole est affectée par les maladies causées par les bactéries phytopathogènes de types *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), responsables respectivement du flétrissement bactérien (BB) et de la strie foliaire (BLS). La résistance variétale est un des moyens les plus efficaces pour contrôler ces maladies dans les différentes conditions agro-écologiques de la riziculture. La caractérisation de la diversité des souches de *X. oryzae* de même que l'identification de sources à large spectre de résistance (BSR) sont un préalable indispensable à cette approche. Nous avons ainsi conduit des prospections dans les différentes zones rizicoles au Mali, établi une large collection de souches de *X. oryzae* qui a ensuite été caractérisée. A partir de cette collection, nous avons étudié la réaction d'un panel de variétés de riz vis-à-vis de la résistance au flétrissement bactérien et à la strie foliaire. Ceci nous a permis d'identifier des sources de résistance, des QTLs (quantitative trait loci) et gènes BSR associés à cette résistance. Le criblage de 12 lignées de riz quasi iso-géniques (NILS, IRBBs) et leur parent récurrent IR24 a permis l'identification de 7 races, notées de A3 à A9 parmi les souches de *Xoo*. La plupart des gènes de résistance testés se sont révélés inefficaces contre la plupart des races de *Xoo* présentes au Mali. Le gène de résistance *Xa3* est le plus efficace parmi les 13 testés pour le contrôle du BB au Mali, cependant, sa résistance est contournée par les souches *Xoo* de la race A9. L'absence de gène de résistance permettant de contrôler la race A9 représente un danger non négligeable pour la riziculture au Mali. Nous avons ainsi testé l'efficacité d'un panel de 29 variétés de riz cultivées pour leur résistance aux souches de *X. oryzae*. Les variétés Gigante et SK20-28 sont résistantes à l'ensemble des races et souches de *Xoo* et *Xoc* du Mali. Ces travaux nous ont permis de caractériser huit pathotypes au sein des *Xoo* (P1 à P8) et onze au sein des *Xoc* (P1 à P11). La faible association entre les races et les pathotypes de *Xoo* suggère que le déterminisme sous-jacent la résistance de Gigante et SK20-28 à *Xoo* est différent de celui des gènes R connus. Deux études de GWAS (genome-wide association study) ont été conduites. La première a permis d'exploiter une population MAGIC *indica* (Multiparent Advanced Generation Intercross) afin de cartographier les QTLs majeurs conférant une résistance à large spectre à *Xoo* et *Xoc*. Les lignées MAGIC ont été génotypées par GBS et phénotypées en serre et au champ par inoculation artificielle en utilisant plusieurs souches de *Xoc* et *Xoo* représentatives de la diversité rencontrée au Mali. Une combinaison d'analyses GWAS et de cartographie d'intervalles a révélé au moins trois QTL intéressants (qXO-2-1, qXO-4-1 et qXO-11-2) conférant une résistance efficace contre les deux pathovars. La deuxième a porté sur un panel de 258 lignées de riz *indica* séquencées issues du projet « 3000 génomes » (ou 3K) et sélectionnées en fonction de leurs origines (89 pays). Ces lignées ont été testées avec des souches *Xoo* et *Xoc*. Cette étude a permis d'identifier un QTL à large spectre de résistance sur le chromosome 4. Au total, 5 gènes candidats associés aux marqueurs SNP, indel et au phénotype de résistance ont été identifiés dans la région du chromosome 4 parmi lesquels deux sont majeurs et très efficaces contre *Xoo* et *Xoc*, Os04g53120 (un variant du gène *Xa1*) et Os04g53160. Les résultats présentés dans cette thèse contribuent à une meilleure connaissance des maladies bactériennes causées par *Xoo* et *Xoc*. Ils apportent un éclairage nouveau sur le déterminisme génétique de la résistance et devraient contribuer de manière significative à un meilleur contrôle des bactérioses foliaires au Mali.

## Abstract :

In Mali, rice production is affected by diseases caused by phytopathogenic bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) responsible respectively for bacterial leaf blight (BB) and bacterial leaf streak (BLS). Varietal resistance is one of the most effective ways to control these diseases under the different agro-ecological conditions of rice cultivation. Characterization of the diversity of *X. oryzae* strains as well as the identification of broad-spectrum resistance sources (BSRs) are prerequisites for this approach. During the study, a collection of strains of *X. oryzae* obtained from different rice growing areas in Mali was characterized in order to examine the response of a panel of rice varieties to BB and BLS. Thus, the identification of sources of resistance, QTLs (quantitative trait loci) and BSR genes associated with resistance were revealed. The screening of 12 isogenic rice lines (NILS, IRBBs) and their recurrent parent IR24 revealed the presence of 7 races, noted from A3 to A9 among the *X. oryzae* pv. *oryzae* strains. Most of the known resistance (R) genes were proved ineffective against several *Xoo* races found in Mali. The *Xa3* resistance gene is the most effective of the 13 lines and recurrent parent tested in controlling BB disease in Mali. However, its resistance is circumvented by *Xoo* strains belonging to race A9. The absence of a resistance gene to control the race A9 represents a significant challenge for rice growing in Mali. We tested the response of a panel of 29 varieties of rice for resistance to *X. oryzae* strains. The data showed that varieties Gigante and SK20-28 are resistant to all races and strains of *Xoo* and *Xoc* from Mali. Further, eight pathotypes within strains of *Xoo* (P1 to P8) and eleven within strains of *Xoc* (P1 to P11) were characterized. We observed a weak association between *Xoo* races and pathotypes, suggesting that the determinism underlying Gigante's resistance and SK20-28 to *Xoo* is different from the known R genes. Two genome-wide association studies (GWAS) were conducted. The first one exploited a MAGIC *indica* (Multiparent Advanced Generation Intercross) population to map the major QTLs conferring broad-spectrum resistance to *Xoo* and *Xoc*. A combination of GWAS analysis and interval mapping revealed at least three interesting QTLs (qXO-2-1, qXO-4-1 and qXO-11-2) conferring effective resistance against both pathovars. The second study focused on a panel of 258 *indica* rice lines sequenced from the "3000 genomes" (or 3K) project and selected according to their origins (89 countries). These lines were tested with *Xoo* and *Xoc* strains. The data revealed a dozen of QTLs including a QTL with a broad spectrum of resistance on chromosome 4. In total, 5 candidate genes associated with SNP, indel and resistance phenotype markers were identified in the region of chromosome 4, among which two are major and highly effective against *Xoo* and *Xoc*, Os04g53120 (variant of *Xa1* gene) and Os04g53160. Taken together, the results shed new light on the genetic determinism of bacterial resistance and should contribute significantly to a better control of *Xanthomonas* in Mali.

*Je dédie cette thèse à ma chère mère que j'aime beaucoup*

*Source inépuisable d'amour, et de bienfaits, tes prières et tes bénédictions ne nous ont pas fait défaut. Tes conseils nous ont été d'un secours inestimable tout au long de nos vies, surtout dans la construction de l'entente fraternelle.*

*Même, de si loin, je vois encore, les oiseaux sur ton toit, picorer les graines auxquelles tu les as habitué. Les mots me manquent pour exprimer mon affection et ma reconnaissance pour toi.*

*Le transcendant n'a-t-il pas prévenu, « le paradis d'un enfant se trouve au pied de sa maman »*

*Qu'Il t'accorde sa grâce et sa miséricorde*

## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de mes travaux et rédaction de thèse.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice de thèse, Dr Valérie Verdier, Directrice de l'UMR IPME, IRD, pour toute son aide. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller tout au long de cette thèse. Je suis touché par son esprit de collaboration, et demeure convaincu que son initiative de partenariat avec le LBMA repoussera les limites de la biologie intégrative des plantes en Afrique. Cette thèse est un produit de ce partenariat après celle du Dr Hinda Doucouré et d'autres nombreux projets en cours qui trouvent leur cadre dans la JEA Coana.

J'adresse tous mes remerciements à mon codirecteur de thèse, Prof. KOITA Ousmane, Directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) pour m'avoir accepté au labo, conduit mes travaux de master en Amélioration des plantes, et m'avoir confié par la suite la gestion de l'unité de Biotechnologie Végétale. Je ne peux oublier ce jour, quand vous êtes passé au département de Biologie de la FST pour défendre ma candidature au master. Votre initiative de créer une unité au sein du LBMA pour les acteurs du monde végétal afin d'apporter une réponse cohérente aux problèmes des paysans producteurs a été salutaire pour nous tous. Sous votre leadership, en cultivant les bonnes relations avec l'IRD et partenaires tels que l'équipe du Pr. Jan Leach de l'Université d'Etat de Colorado, vous avez contribué à renforcer significativement le niveau de compétence de notre Université tout en atteignant les objectifs de départ. Cette thèse illustre votre volonté de répondre aux questions de développement et de renforcement des capacités dans le contexte local.

Je tiens à remercier, Dr. Sébastien Cunnac, chercheur de l'IRD au sein de l'équipe GTIPP de l'UMR IPME, tu m'as apporté ton soutien sans condition tout au long de cette thèse malgré la charge d'encadrement de tes propres thésards et de gestion de tes projets de recherche. Tes conseils et ta contribution dans l'analyse des données et la correction du papier « race » étaient remarquables. Pour tout ce que tu as fait pour une meilleure réalisation de cette thèse, Dr Valérie ne s'est pas trompée, accepte le statut d'invité.

Je tiens à remercier très chaleureusement mon compagnon Alexis Dereeper, ingénieur en bio-informatique à l'IRD UMR IPME, pour son amitié et son soutien sans faille dans les analyses du chapitre 3 et 5 et son accompagnement dans ma formation à l'analyse GWAS et QTLs.

Je tiens également à remercier le Dr. Boris Szurek, responsable de l'équipe GTIPP de l'UMR IPME à l'IRD, pour la qualité de son écoute et ses nombreux conseils. Merci de m'avoir accueilli au sein de l'équipe et de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse.

Je remercie le Dr Ralf Koebnik pour m'avoir également accueilli dans l'équipe GTIPP à l'IRD et pour nos discussions.

Je tiens également à remercier le Dr. Mathilde Hutin, chercheur à l'IRD UMR IPME, pour son appui sans faille dans la correction d'une partie du premier chapitre de ma thèse. Ta motivation profonde pour travailler avec nous en Afrique Subsaharienne te conduira à nous rejoindre, du moins nous l'espérons!

Il m'est impossible d'oublier Hamidou Tall, chercheur à l'ISRA Sénégal pour sa collaboration sur les sujets qui nous préoccupent également tous les deux (les bactérioses du riz en Afrique Sub-Saharienne) et pour être venu passer du temps avec nous au LBMA. Merci aussi à Florence Auguy, Sandrine et Ganna pour leur aide précieuse à l'IRD et pour l'invitation à Carcassonne.

Je remercie tous les membres de mon comité de thèse, Dr Christian Vernière (CIRAD), Dr ALBAR Laurence, chercheur à l'IRD UMR DIADE, Dr SABOT François, chercheur à l'IRD UMR DIADE, pour leur analyses critiques et constructives tout au long de ma thèse. Vous avez joué un rôle fondamental dans la réalisation de cette thèse.

Je remercie le pôle administratif de l'UMR IPME, Mme Nathalie Pujet, Mme Isabelle Sciacco et Mme Clotilde Sabot pour leur soutien tout au long de ma thèse. Merci pour votre appui lors de la mise en place de mes séjours en France et pour avoir facilité de nombreuses fois mon accueil sur le centre IRD

Je tiens aussi à remercier le Dr. Haby SANOU, Directrice de recherche à l'Institut d'Economie Rurale et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Bamako, Mali et au Dr. Tristan BOUREAU, Maître de conférences à l'Université d'Angers qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

J'exprime ma gratitude au Dr. Véronique JORGE, Chargée de recherche à l'INRA, le Dr. Sarra SOUNGALO, Directeur de Recherche au CRRA de l'Institut d'Economie Rurale pour nous avoir accueillis dans la zone de l'Office du Niger durant les prospections de terrain et pour ses conseils sur mes travaux, le Pr. Michel LEBRUN de l'Université de Montpellier, qui ont bien voulu être examinateurs de ma thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe Riz/*Xanthomonas* du LBMA, Ibrahim Keita, Dr. Hinda Doucouré, Mamadou Dembele du CRRA de Niono et, les stagiaires ingénieurs et étudiants qui n'ont ménagé aucun effort pour la bonne réussite de cette thèse. Le directeur, Prof Koita, après nous avoir observé ensemble à l'IER/Sotuba lors des tests de l'inoculation des plants de riz, n'a-t-il pas dit « Qu'ils ont réussi à former une belle équipe de recherche ». Je n'oublie pas le Dr Karim DAGNO et le Pr Mamadou Diourté (IER Sotuba) pour avoir grandement facilité la mise à disposition du terrain d'expérimentation au CRRA de Sotuba.

Et enfin, notre reconnaissance va à l'endroit de l'IRD au travers de son dispositif de soutien au renforcement des capacités et de partenariat et dont nous avons bénéficié via la JEA CoANA. Merci pour le soutien financier durant les prospections et surtout au Dr Bruno SICARD, représentant de l'IRD au Mali pour son appui tout au long de ses années. Je remercie les institutions de financement comme le SCAC (Ambassade de France au Mali), le Programme de Formation des Formateurs (PFF/USTTB), la Fondation Internationale pour la science (FIS) et le programme BEST de l'IRD pour les soutiens financiers dont j'ai bénéficié sous forme de bourse durant mes différents séjours en France.

Je ne peux clore les remerciements sans témoigner ma reconnaissance à l'égard de mes frères et sœur, Fatoumata, Directrice d'école, Ibrahim, Prof agrégé en génécologie obstétrique, Papa, PhD en Parasitologie et docteur en Pharmacie ie, Gagny, styliste, Aboubacre, Docteur en Pharmacie, Bah, sélectionneur sorgho/mil (IER), Sidy, expert-comptable et le benjamin, Boubacar, Prof en Mathématique et expert en réseau et sécurité informatique, pour tout leur soutien lors de cette thèse. Je ne peux également oublier de remercier ma femme, Dr Sissouma Fatoumata pour tout son soutien

durant ces années de thèse et qui durant les travaux de criblage variétal à l'IER et malgré ses responsabilités professionnelles et familiales, apportait très souvent de la nourriture à toute l'équipe de recherche sur la parcelle d'expérimentation. A tous nos enfants, Abdrahamane, Ibrahim, Youssef, Khadidja et Mouhamad, cette thèse est la vôtre.

## Abréviations

AA: Acidic Activation Domain

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

AGP: Plant Production and Protection Division / FAO

ANOVA: Analysis of Variance

APS: Associations des paysans

ARN: Acide Ribonucléique

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

BAI: Burkina ADRAO IRD

BC: Backcross

BGI: Beijing Genomics Institute

BGI-RIS: Beijing Genomics Institute Rice Information System

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - NCBI - NIH

BB: Bacterial Leaf Blight

BLS: Bacterial Leaf Streak

CFU: Colony Forming Unit

DH: Double Haploid

DL: Déséquilibre de Liaison

DNSI: Direction Nationale de la Statistique.

DPI : Dot per inch (en français, point par pouce)

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

EPS: Exopolysaccharides

EST: Expressed Sequences Tags

ETI: Effector Triggered Immunity  
ETS: Effector-Triggered Susceptibility  
FAO: Food and Agriculture Organisation  
HR: Hypersensitive responses  
Hrp: Hypersensitive Response and Pathogenicity  
InDels: Insertion-Délétion  
INSTAT: Institut National de la Statistique  
IRD: Institut de Recherche pour le Développement  
IRGC: International Rice Genebank Characterization  
IRGSP: International Rice Genome Sequencing Project  
IRRI: International Rice Research Institute  
LAR: Locally-Acquired Resistance  
LL: Lesion Length  
LPS: Lipopolysaccharides  
LRR: Leucine Rich Repeat  
MAI: Mali ADRAO IRD  
MAMPS: Microbe-Associated Molecular Patterns  
NaCl: Chlorure de sodium  
NAI: Niger ADRAO IRD  
NBS: Nucleotide Binding Site  
NERICA: New Rice for Africa  
NIL: Near Isogenic Line  
PAMPS: Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PCR: Polymerase chain reaction  
PRRs: Pathogen Recognition Receptors  
PSA: Peptone Sucrose Agar

PTI: PAMP-Triggered Immunity

QTL: Quantitative Trait Locus

RAM: Riz Africain du Mali

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

REP-PCR: Repetitive element palindromic PCR)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RiceGAAS: Rice Genome Automated Annotation System

RYMV: Rice Yellow Mottle Virus

SAM: Sélection Assistée par Marqueurs

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSA : Afrique subsaharienne

TAL: Transcription Activator Like

t-DNA: Target-Desoxyribonucleic Acid

T3SS: Type III Secretion System

VNTR: variable-number tandem-repeat

*Xoo: Xanthomonas oryzae pv. oryzae*

*Xoc: Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*

## Table des matières

Résumé : .....	i
Abstract : .....	i
Remerciements .....	iii
Abréviations .....	vi
Liste des tableaux: .....	xiv
Liste des Figures:.....	xv
<b>Chapitre 1: Revue de littérature.</b> .....	1
I: Le riz : .....	1
1.1. L'origine et la systématique du riz : .....	1
1.2. Diversité génomique du riz : .....	3
1.3. Développement de lignées quasi isogéniques (NIL/IRBB) : .....	6
1.4. Les populations MAGIC du riz: .....	8
1.5. Le nouveau riz pour l'Afrique, les lignées NERICA : .....	10
2. Le Riz au Mali : .....	10
2.1. Le statut du riz dans la politique agricole nationale: .....	10
2.2. Types de riziculture: .....	11
2.2.1. Riziculture irriguée avec maîtrise totale de l'eau : .....	11
2.2.2. Riziculture pluviale, NERICA : .....	12
2.2.3. Riziculture en submersion contrôlée : .....	12
2.2.4. Riziculture dans les bas-fonds : .....	12
2.2.5. Culture traditionnelle en submersion libre, riz flottant : .....	13
2.3. Ressources phylogénétiques : .....	14
2.4. Importance du riz dans l'économie nationale : .....	14
2.5. Les contraintes de la riziculture au Mali : .....	14
2.5.1. Les contraintes biotiques: .....	15
II. Les maladies bactériennes du riz causées par les <i>Xanthomonas oryzae</i> : .....	17
2.1. Distribution géographique du BB et BLS : .....	17
2.2. Modes d'infection, symptômes et épidémiologie des bactérioses causées par <i>X. oryzae</i> : .....	19
2.2.1. Le flétrissement bactérien du riz: .....	19
2.2.2. La maladie à stries foliaires translucides : .....	20
2.3. Impact économique : .....	21
2.4. Méthodes de lutte : .....	22
2.5. Diversité génétique des souches de <i>Xanthomonas oryzae</i> : .....	24

2.5.1. Historique de <i>X. oryzae</i> :.....	24
2.5.2. Caractéristiques physiologiques et morphologiques de <i>X. oryzae</i> :.....	24
2.5.3. Diversité et structure des populations de <i>Xanthomonas oryzae</i> :.....	25
2.5.4. Génomique comparative des <i>Xanthomonas oryzae</i> : .....	28
2.5.5. Diversité pathotypique (phénotype) des <i>Xanthomonas oryzae</i> : .....	30
III. Les interactions plantes pathogènes:.....	32
3.1 Défense constitutive :.....	34
3.2 Défenses induites : .....	34
3.2.1 L'immunité déclenchée par un PAMP ou PTI (PAMP-Triggered Immunity):.....	34
3.2.2. De la suppression du PTI et ETI (Effector-Triggered Immunity), ETS (Effector Triggered Susceptibility) aux réponses de défenses de l'hôte: .....	35
IV. Mécanisme moléculaire des interactions riz- <i>Xanthomonas oryzae</i> : .....	41
4.1 Déterminisme moléculaire de la pathogénicité chez <i>Xanthomonas oryzae</i> :.....	41
4.1.1. Le système de sécrétion de type III (SST3) :.....	41
4.1.2. La famille d'effecteurs de type TALs (transcription-activator like) : .....	44
4.1.3. Effet des TALEs dans la sensibilité du riz aux <i>Xanthomonas oryzae</i> : .....	50
4.1.4. Les gènes d'avirulence chez <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> : .....	54
4.2.1. Résistance à la BB conférée par la protéine kinase du récepteur LRR :.....	56
4.2.2 Résistance à la BB conférée par la protéine de la classe de MtN3: .....	56
4.2.3. Résistance au flétrissement bactérien déclenchée par les effecteurs TAL :.....	57
4.2.4. Résistance à la BB conférée par une protéine NBS-LRR :.....	60
4.2.5. Résistance à la BB conférée par une autre classe de protéines exprimée par xa5 :.....	61
4.3. Les gènes de résistance identifiés contre <i>Xanthomonas oryzae</i> :.....	62
V. De l'identification des QTLs par la génétique d'association à la confirmation des loci candidats: ..	64
5.1. Détection de QTLs par la génétique d'association (GWAS): .....	65
5.2. Identification de gènes candidats: .....	67
5.3. Validation des gènes candidats :.....	68
<b>Projet de thèse</b> .....	69
I. Introduction générale:.....	69
L'objectif général de la thèse .....	71
<b>Chapitre 2 : L'étude de la diversité phénotypique des souches de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> révèle l'existence de nouvelles races et renseigne sur les sources de résistance à déployer pour le contrôle de la bactériose foliaire au Mali.</b> .....	74
1. Contexte .....	74
2. Matériels et méthodes .....	75

3. Résultats et discussion .....	75
4. Perspectives:.....	76
<b>Chapitre 3 : La caractérisation des profils de virulence de <i>Xanthomonas oryzae pv. oryzicola</i> au Mali révèle l'existence de variétés possédant une résistance à large spectre contre le BLS.....</b>	<b>106</b>
Résumé.....	106
1. Introduction:.....	107
2. Matériels et Méthodes.....	108
2.1. Collection des isolats de <i>X. oryzae pv. oryzicola</i> : .....	108
2.2. Tests de pathogénicité: .....	109
2.3. Analyse statistique des données: .....	110
3. Résultats et discussion .....	110
3.1. Collecte des isolats maliens et évaluation de leur pouvoir pathogène sur la lignée sensible Kitaake:.....	110
3.2. Le criblage de la variété Kitaake <i>Rxo1</i> révèle que le transgène ne peut être déployé au Mali	111
3.3. Un crible des variétés cultivées au Mali pour la résistance contre BLS révèle que SK20-28 et Giganté possèdent une résistance large contre les onze pathotypes de la collection Malienne de <i>Xoc</i>	112
4. Références bibliographiques : .....	113
Les tableaux.....	116
<b>Chapitre 4 : Variation allélique de la résistance à large spectre et de la sensibilité aux <i>Xanthomonas oryzae (Xoo et Xoc)</i> au sein de la population de riz MAGIC.....</b>	<b>123</b>
1. Contexte: .....	123
2. Matériels et Méthodes.....	124
3. Principaux résultats: .....	125
4. Perspectives:.....	126
5. Principales références bibliographiques .....	126
<b>Chapitre 5 : Identification par GWAS de gènes à large spectre de résistance contre le flétrissement bactérien et la strie foliaire dans un panel de riz indica (projet 3K).....</b>	<b>138</b>
Résumé.....	138
1. Introduction.....	139
2. Matériel et méthodes.....	141
2.1. Matériels végétal.....	141
2.2. Dispositif expérimental et conditions de culture .....	141
2.3. Souches de <i>Xanthomonas oryzae</i> utilisées pour le criblage des 258 accessions d' <i>indica</i>	142

2.4.	Données de séquençage et filtrage des variants génomiques :.....	143
2.5.	Analyse de structure de la population et analyse PCA.....	143
2.6.	Analyse de génétique d'associations à l'échelle du génome (GWAS).....	144
2.7.	Prédiction de l'emplacement du SNP et de son annotation .....	144
2.8.	Analyse du déséquilibre de liaison et des haplotypes des QTLs .....	144
2.9.	Prédiction des accessions porteuses des allèles R dans la base de données 3K.....	145
2.10.	Aperçu du contexte génomique des gènes R.....	145
3.	Résultats et discussion .....	145
3.1.	Le panel d'accessions sélectionnées est représentatif du groupe indica de la collection 3K 145	
3.2.	Le criblage des accessions indica révèle des sources à large spectre de résistance contre BB et BLS.....	146
3.3.	L'analyse GWAS révèle un QTL majeur sur le chromosome 4 des accessions <i>indica</i> , pour l'ensemble des souches de <i>Xanthomonas oryzae</i> .....	147
3.4.	Des marqueurs hautement significatifs, localisés dans les gènes de résistance, expliquent plus de 90% de la résistance .....	148
3.5.	Focus sur les loci Os04g53120 et Os04g53160 très efficaces contre <i>Xoo</i> et <i>Xoc</i> .....	150
3.6.	Le gene Os04g53120 ( <i>Xa1</i> ) portant la délétion sur son promoteur avec une bonne couverture de son extrémité 3' terminale (domaine LRR) gouverne la résistance de SK20-28 et de Giganté .....	152
4.	Conclusions.....	153
5.	Références bibliographiques:.....	154
	Les Figures:.....	157
	<b>Chapitre 6 : Discussion Générale</b> .....	163
1.	La structure des populations de <i>Xoo</i> et <i>Xoc</i> apparaissent diverses et évoluent dans le temps. 165	
2.	<i>Oryza sativa indica</i> possède des sources de résistance efficaces contre BB et BLS .....	167
3.	Les gènes de résistance connus et efficaces pour le contrôle du BB et du BLS en Asie, le sont beaucoup moins au Mali. ....	169
4.	Les populations de <i>Xoo</i> et <i>Xoc</i> du Mali induisent une résistance spécifique chez le riz.....	170
5.	Stratégies de déploiement d'une résistance durable contre les bactérioses du riz .....	171
	<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	175
1.	Conclusion générale : .....	175
2.	Perspectives:.....	176
	Annexe.....	178
	Publications Check Tekete.....	178

2. Poster avec publication dans revue .....	179
3. Communications.....	179
4. Autres .....	181
<b>References bibliographiques de la thèse .....</b>	<b>182</b>

## Liste des tableaux:

### Chapitre 1

Tableau 1 Systématique du riz .....	2
Tableau 2: Liste des IRBB utilisés comme différentiel international et proposé pour la caractérisation des races de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .....	7
Tableau 3: Différentes races de Xoo en Asie et Afrique caractérisées une gamme de NILs (IRBBs) de l'IRRI. ....	31
Tableau 4: Nombre d'effecteurs TAL chez les bactéries phytopathogènes.....	44
Tableau 5: Les gènes de résistance BB caractérisés au niveau moléculaire. ....	55
Tableau 6: Focus sur les gènes de résistance au flétrissement bactérien du riz. ....	63

### Chapitre 2

Tableau 1: Liste des IRBB utilisés comme différentiel international et proposé pour la caractérisation des races de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> .....	17
Tableau 2: Races of Xoo on twelve near isogenic rice lines (NILs) containing a single resistance gene in IR24 genetic background .....	19
Tableau 3: Geographical distribution of races of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> in two regions in Mali.....	20
Tableau 4: Characterization of eight pathotypes among strains of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> in Mali.....	21
Supplemental Table 1. List of rice varieties used for resistance screening against <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> in Mali .....	22
Supplemental Table 2: Race characterization of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> strains.....	23

### Chapitre 3

Tableau 1: Liste des souches de <i>Xoc</i> isolées au Mali entre 2010 et 2013 et utilisées dans cette étude. ....	116
Tableau 2: Phénotype des variétés évaluées avec 6 souches de <i>Xoc</i> .....	117
Tableau 3: Profil de virulence des pathotypes de <i>Xoc</i> sur les sept variétés les plus efficaces contre les isolats de la collection malienne. . ....	118

### Chapitre 4

Tableau: 1 Quantitative trait loci (QTL) effective to multiple <i>X. oryzae</i> strains identified in this study. ....	1564
--	------

### Chapitre 5

Tableau 1: Résumé des marqueurs significatifs (SNP et indels) détectés par les analyses GWAS (modèle MLM-K + Q) parmi les différentes souches de <i>Xanthomonas</i> . ....	160
--	-----

## Liste des Figures:

### Chapitre 1

Figure 1: Carte montrant le foyer d'origine de la domestication du riz africain, il y a plus de 3000 ans. Source: .....	3
Figure 2: Classification des 3000 accessions de riz en cinq groupes variétaux distincts .....	5
Figure 3: Les différentes étapes de la sélection des lignées quasi-isogéniques pour la résistance au flétrissement bactérien (IRBB).. .....	6
Figure 4: Schéma de croisement pour la réalisation de quatre populations de riz MAGIC. ....	9
Figure 5: Distribution géographique des systèmes de riziculture au Mali. ....	13
Figure 6: Distribution géographique mondiale de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> . ....	18
Figure 7: Distribution géographique mondiale de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (Xoc). ....	18
Figure 8: Symptômes et spécificité tissulaire des pathovars de <i>Xanthomonas oryzae</i> . ....	20
Figure 9: Photographie de la morphologie de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> . . ....	25
Figure 10: Diversité génétique et pathotypique de 65 souches chinoises de Xoc basées sur l'analyse des effecteurs TALE et l'évaluation de la résistance de 23 lignées de riz contenant chacune un gène de résistance contre BB. ....	27
Figure 11: MST ("Minimum spanning tree") d'une collection mondiale de <i>Xanthomonas oryzae</i> à l'aide de Bionumerics 7.1 . ....	27
Figure 12: Réseau d'haplotypes (Consensus split network) de <i>Xanthomonas oryzae</i> basé sur la MLST de six gènes de ménage concaténés . ....	28
Figure 13: Alignement des génomes complets de <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> BLS256 (Xoc) avec les génomes de <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331 (XooK), <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> MAFF311018 (XooM), et <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> PXO99A (XooP). . ....	30
Figure 14: Profils d'hybridation de Southern blot et relations entre les races et les clusters phylogénétiques basés sur l'analyse RFLP des séquences d'insertion ISXo1. ....	32
Figure 15: Modèle en Zig-Zag illustrant la coévolution entre les gènes de résistance et les effecteurs impliqués dans la virulence des pathogènes. ....	33
Figure 16: Représentation des trois modèles d'interaction entre protéines de résistance et protéines d'avirulence. . ....	37
Figure 17: Les forces de Sélection opposées sur des cibles effectrices gardées dans une population végétale polymorphique pour les gènes R. ....	39
Figure 18: De l'infection de lignées de tomate sensibles par <i>Pseudomonas syringae</i> à l'activation du complexe immunitaire Pto / Prf dans les lignées résistantes. ....	40
Figure 19: Schéma du système de sécrétion de type III (SST3) chez les bactéries phytopathogènes (en fonction). . ....	42
Figure 20: Modèles de régulation des gènes du système Hrp chez les bactéries phytopathogènes. ..	43
Figure 21: Schéma de la structure des effecteurs TAL de <i>Xanthomonas</i> . ....	46
Figure 22: Base de la spécificité et structure de l'association effecteur TAL-ADN cible. ....	49
Figure 23: Arbre phylogénétique des protéines OsSWEET. . ....	52
Figure 24: Induction de gènes SWEET par <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> . . ....	53
Figure 25: Les TALEs dans l'induction de la maladie et de la résistance chez les plantes: .....	58
Figure 26: Activation des protéines de résistance de type NBS-LRR. ....	61

Figure 27: Q-Q plot de GLM et MLM sur les mêmes données. ....	66
Figure 28: Manhattan plot (MLM) illustrant l'analyse GWAS de résistance du Riz à la souche Xoo PXO61 de la race 1 des Philippines. ....	67

## Chapitre 2

Figure 1: Map of Mali showing the different rice regions visited and the geographical distribution of <i>Xoo</i> races .....	24
Figure 2: Virulence of forty-five isolates of <i>Xoo</i> on the rice variety Azucena. ....	25
Figure 3: Efficiency of rice resistance genes ( <i>Xa</i> ) in IRBB lines to forty-five isolates of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ... ..	26
Figure 4: BB susceptibility profile of twenty-nine rice varieties cultivated in Mali. ....	27
Figure 5: Virulence profile clustering of Malian <i>Xoo</i> isolates and the resistance level of six rice varieties tested. ....	28
Supplemental Figure 1. Overall virulence of fourteen isolates of <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> on a panel of rice varieties grown in Mali. ....	29

## Chapitre 3

Figure 1: Virulence des 38 isolats de Xoc sur la variété sensible témoin Kitaake. ....	119
Figure 2: Caractérisation des réactions de 29 variétés testées avec 6 souches de la collection Malienne de Xoc. ....	120
Figure 3: Classification Ascendante Hiérarchique de la virulence (qualitative) de 38 souches Xoc évaluées sur les 7 variétés les plus résistantes et deux sensibles témoins.....	121
Figure 4: Réactions des variétés les plus résistantes et deux sensibles témoins, à l'inoculation de l'ensemble des souches Xoc testées.. ....	121

## Chapitre 4

Figure 1: Distribution of lesion length (cm) of MAGIC indica founders and S8 subset. (a) Screening of 323 AILs in the greenhouse with Xoc BAI5.....	1561
Figure 2: Quantitative trait loci (QTL) detection for resistance to Xoc BAI5 and Xoo MAI136 in MAGIC indica S4 and S8 subsets. ....	1562
Figure 3: Integrative map showing resistance QTL to African and Asian Xoc and Xoo found in this study.....	1563
Figure 4: Haplotype block analyses and SNP effects in a hot spot region for <i>X. oryzae</i> resistance within qXO-4-1.. ....	1565

## Chapitre 5 :

Figure 1: Représentativité du groupe indica 3K (au nombre de 1770 accessions) par le panel des 258 accessions sélectionnées suivant leurs origines géographiques pour les analyses GWAS .....	157
---	-----

Figure 2: Analyse des données phénotypiques .....	158
Supplemental Figure 1. Structure de la population. A. Structure de la population d'un panel de 258 accessions indica obtenue avec sNMF. ....	158
Supplemental Figure2: Quantile-quantile plots pour différents modèles testés pour GWAS: GLM, MLM-K et MLM-K + Q. ....	159
Figure 4: Etude d'association pangénomique (GWAS) basé sur les marqueurs (SNP et indels) associés à la résistance des accessions indica aux souches maliennes de Xoo et Xoc. Les analyses ont été faites suivant le modèle MLM-K + Q. ....	159
Figure 5: Combinaison des marqueurs de cinq gènes NBS-LRR couverts par la région QTL du chromosome 4.....	160
Figure 6: La duplication des gènes R dans le QTL majeure du chromosome 4 explique le niveau élevé d'hétérozygotie .....	161
Figure 7: : L'analyse de la profondeur de couverture des reads sur le long du gène Xa1. ....	162
Figure 8: Structure des chromosomes de SK20-28 SK20-2 issue du croisement entre Giganté et Kogoni 91-1.....	162

# Chapitre 1

Revue de littérature

# Chapitre 1: Revue de littérature.

## I: Le riz :

### 1.1. L'origine et la systématique du riz :

Le riz appartient à l'embranchement des Angiospermes, la classe des monocotylédones, la sous-classe des commeliniideae, l'ordre des poales, la famille des poaceae, au genre *Oryza* et à l'espèce *Oryza spp*. Le genre *Oryza* compte 23 espèces (tableau 1), dont deux diploïdes ( $2n = 24$ ) de génome AA et annuelles à autogamie prépondérante sont domestiquées (Sweeney and McCouch 2007)

En effet, le riz asiatique, *Oryza sativa*, sous-famille des Oryzoideae, originaire d'Asie, est avec le riz africain, *Oryza glaberrima*, sous-famille des Oryzoideae, les deux espèces cultivées du genre *Oryza*. Ces espèces ont divergé génétiquement il y a environ deux millions d'années, bien avant leur domestication par l'homme (Cubry et al. 2018; Vitte et al. 2004). La distribution de la 1<sup>ère</sup> est mondiale alors que la seconde, *Oryza glaberrima* est endémique à l'Afrique de l'Ouest.

*Oryza sativa* compte deux sous-espèces, les riz collants (*japonica*) et non collants (*indica*). Il existe plus de 150 000 variétés cultivées de cette espèce dans le monde. La banque de gènes entretenue par l'Institut International de Recherche sur le Riz (IRRI) comptait près de 128 000 accessions en 2017 et 4647 accessions d'espèces sauvages apparentées. La Banque Nationale Chinoise de Gènes de Cultures (CNCGB) de l'Institut des Sciences des Cultures et des Sciences Agricoles de l'Académie Chinoise (CAAS) dispose de plus de 61470 accessions de la même espèce. Les deux sous-espèces ont des origines géographiques différentes. La sous-espèce *indica* est originaire de l'Asie tropicale (Inde) et se caractérise par un fort tallage et des grains longs et fins tandis que la sous-espèce *japonica*, originaire de la zone tempérée et subtropicale de l'Asie (Chine), a un tallage moyen et des grains courts et ronds. Les différences entre ces deux groupes sont documentées dans la littérature chinoise depuis des temps très anciens, an 100 du calendrier julien (Garris et al. 2005). Des études de Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP) confirment cette distinction, mais en 1987, en recourant à une étude de 15 loci codant pour des isoenzymes, des auteurs ont pu distinguer six groupes variétaux: *indica*, *japonica*, *aus*, *aromatic*, *rayada* et *ashina* (Garris et al. 2005).

*Oryza glaberrima* est originaire du delta centre du Niger d'où elle s'est étendue vers les côtes de l'Afrique occidentale, notamment en Gambie, en Casamance et dans le bassin de Sokoto (Ashikari and Matsuoka 2006). Elle proviendrait de l'espèce spontanée ancestrale *Oryza barthii* et a été domestiquée il y a environ 3 500 ans. Les formes pérennes de *O. rufipogon* seraient à l'origine de l'espèce *O. longistaminata*, et les formes annuelles, les

ancêtres de *O. barthii*, suite à des mouvements de migration de *O. rufipogon* vers l'Afrique (Duncan A. Vaughan et al. 2005). *O. glaberrima* se distingue d'*O. sativa* par une ligule courte et une panicule dressée et peu ramifiée alors que le riz asiatique a une longue ligule et une

Tableau 1: Systématique du riz

COMPLEXES	GROUPE	CHROMOSOMES GENOMIQUE
<b>O SATIVA</b>	<i>O sativa L</i>	24 / AA
	<i>Orufipogon</i>	24 / AA
	<i>O glaberrima Steud</i>	24 / AA
	<i>O barthii A</i>	24 / AA
	<i>O longistaminata</i>	24 / AA
	<i>O meridionalis Ng</i>	24 / AA
	<i>O.glumaepatula Steud</i>	24 / AA
<b>O. OFFICINALIS</b>	<i>Officinalis Wall</i>	24 / CC
	<i>O. minuta</i>	48 / BBCC
	<i>O. rhizomatis</i>	24 / CC
	<i>O. eichingeri</i>	24 / CC
	<i>O. malapuzhaens</i>	48 / BBCC
	<i>O. punctata</i>	24 / BB, 48 / BBCC
	<i>O. latifolia</i>	48 / CCDD
	<i>O. alta</i>	48 / CCDD
	<i>O. grandiglumis</i>	48 / CCDD
	<i>O. australiensis</i>	24 / EE
	<i>O. schlechteri</i>	48 / Inconnu
<b>O. RIDLEYI</b>	<i>O. ridleyi</i>	48 / HHJJ
	<i>O. longiglumis</i>	48 / HHJJ
	<i>O. granulate</i>	48 / GG
<b>O. GRANULATE</b>	<i>O. meyeriana</i>	48 / GG
	<i>O. brachyantha</i>	48 / FF

Source: (Dunca A. Vaughan and Morishima 2003)

panicule légèrement retombante à maturité. Malgré quelques différences telles que le niveau du tallage, la largeur des feuilles, entre les accessions d'*O. glaberrima* de culture aquatique et pluviale, on n'observe pas dans cette espèce des différenciations morphologiques aussi nettes que dans l'espèce *O. sativa*.

Le séquençage du génome complet de 246 accessions de riz conduit lors d'une étude réalisée par les chercheurs de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), du CEA-Génomscope et du Centre du riz pour l'Afrique (Africa Rice), a permis de mettre en évidence le Mali comme étant le berceau du riz *Oryza glaberrima* dans le delta intérieur du fleuve Niger (Figure 1). Cette découverte coïncide avec les traces archéologiques de domestication du riz trouvées dans la zone. L'assèchement du Sahara serait à l'origine de cette domestication et la disparition progressive de ces ressources serait traduite par l'émergence de la forme cultivée et du développement croissant de l'agriculture, il y a plus de 2000 ans (Cubry et al. 2018).

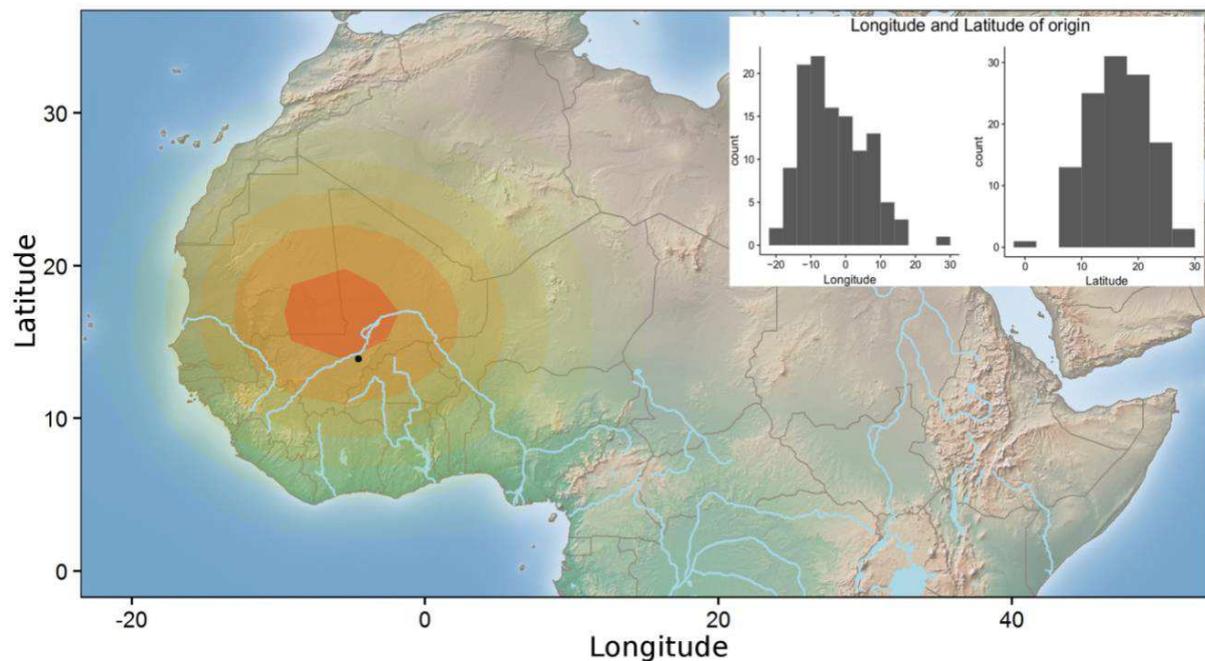


Figure 1: Carte montrant le foyer d'origine de la domestication du riz africain, il y a plus de 3000 ans. Source: (Cubry et al. 2018)

## 1.2. Diversité génomique du riz :

Le riz est réputé pour son extraordinaire diversité génétique à l'intérieur des espèces et des populations, deux fondements essentiels à l'amélioration variétale. Cette riche source de diversité génétique est préservée dans plus de 230 000 accessions d'*Oryza* conservées dans les banques de gènes du monde entier, principalement en Asie (Li et al. 2014) où quelque 180 000 accessions de riz sont conservées à la Collection Internationale de la Banque de Gènes du

Riz (IRGC) à l'IRRI (<http://irri.org/our-work/seeds>) et à la Banque de Gènes Nationale de Cultures de Chine (CNCG) ([http://icgr.caas.net.cn/cgris\\_english.html](http://icgr.caas.net.cn/cgris_english.html)). L'exploration de cette diversité au niveau de la séquence des génomes entiers était un objectif pour la communauté des scientifiques travaillant sur le riz. Ainsi, la recherche sur le riz a beaucoup progressé après l'achèvement du premier génome de riz en 2005 (Chen and Sato 2005), qui a stimulé les efforts mondiaux dans la recherche sur la génomique fonctionnelle du riz (Hirochika et al. 2004; Zhang et al. 2008).

L'Académie Chinoise des Sciences Agricoles (CAAS), l'Institut de Génomique de Beijing (BGI) de Shenzhen et l'Institut international de recherche sur le riz (IRRI) ont lancé et réussi « le projet 3000 génomes de riz ». La réalisation de ce méga projet sur les génomes du riz provenant de 89 pays constitue une étape majeure dans la mise en évidence de la diversité génomique dans toutes les collections mondiales de matériel génétique de riz. Les données de séquençage des 3000 génomes de riz sont désormais déposées dans la base de données GigaScience (GigaDB) <http://dx.doi.org/10.5524/200001> (Li et al. 2014). Environ 18,9 millions de polymorphismes de nucléotides simples (SNP) ont été découverts dans le riz lorsqu'ils ont été alignés sur le génome de référence de la variété japonica tempérée, Nipponbare. La distribution des SNP est très variable selon les chromosomes. Les chromosomes 1, 4 et 11 présentaient les nombres les plus élevés de SNP et les chromosomes 5, 9 et 10 les plus faibles.

Une comparaison sur la base des annotations de gènes fournies par MSU v7 révèle que la plupart des SNP sont détectés dans des régions intergéniques et des introns, <http://rice.plantbiology.msu.edu/> (Kawahara et al. 2013). Seulement 18,24% des SNP sont détectés dans les exons, dont 40% sont synonymes. Les analyses phylogénétiques ont révélé une nette différenciation des 3000 accessions en deux groupes principaux, indica et japonica, deux petits groupes variétaux, les types aus / boro et basmati / sadri, et un petit groupe de types intermédiaires (figure 2). Le groupe *indica* représente le groupe le plus important et le plus diversifié.

Le groupe *japonica* se subdivise en deux sous-groupes bien différenciés, *japonicas* tempérés et *japonicas* tropicaux. Le groupe aus / boro est étroitement apparenté au groupe *indica*, tandis que basmati / sadri est plus étroitement lié au *japonica* <http://dx.doi.org/10.5524/200001> (Li et al. 2014).

La diversité génétique d'*O. glaberrima* est très faible par rapport à *O. sativa* (Second 1982). Une étude de diversité conduite sur 198 accessions d'*O. glaberrima* avec 93 marqueurs microsatellites a révélé l'existence de cinq sous-groupes reflétant la spécialisation écologique de l'espèce (Semon et al. 2005).

La plus grande collection de données génomiques d'*Oryza glaberrima* est de nos jours la base de données générée par les chercheurs IRD, en collaboration avec leurs partenaires du CEA-Génoscope et d'Africa Rice dans le cadre du programme IRIGIN DE France Génomique. Il

s'agit de l'intégralité des séquences de 246 génomes de riz parmi lesquels, on enregistre 163 variétés domestiques et 83 sauvages. Cette importante collection de données génomiques est utilisée pour analyser la diversité génétique des espèces cultivées et pour l'identification des gènes d'intérêts à caractères évolutifs et agronomiques. Un gène, PROG1, associé à un phénotype à architecture végétale érigée, a montré une sélection convergente chez les deux espèces cultivées, *Oryza glaberrima* et *Oryza sativa*. En revanche, un gène SH5, a montré sa signature lors de la domestication du riz africain, mais pas lors de la domestication du riz asiatique (Cubry et al. 2018). *O. glaberrima* est tolérante à de fortes concentrations en fer et possède une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote (Tagawa et al. 2000; Albar et al. 2003; Audebert and Fofana 2009). Plusieurs accessions possèdent une résistance au virus de la panachure jaune du riz (ou RYMV pour Rice Yellow Mottle Virus) (Albar et al. 2003), aux nématodes (Reversat and Destombes 1998; Soriano et al. 1999) et présentent une bonne compétitivité à l'égard des adventices liée à un tallage précoce (Johnson et al. 1998). Une collection de plus de 3000 accessions de *O. glaberrima* et *O. barthii* est disponible à l'Africa Rice (ex ADRAO) (<http://www.warda.org>) et à l'IRRI (<http://www.irri.org>).

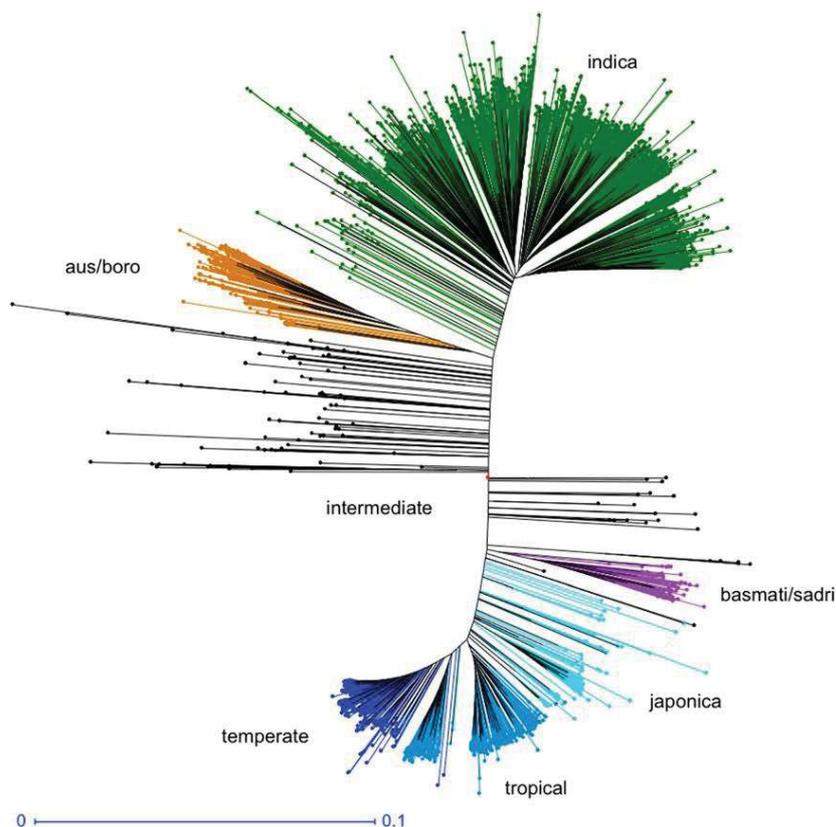


Figure 2: Classification des 3000 accessions de riz en cinq groupes variétaux distincts sur la base de 5 séries de 200 000 ensembles aléatoires parmi les 18,9 millions de variant SNP mis en évidence. Source: (Z. Li et al. 2014)

### 1.3. Développement de lignées quasi isogéniques (NIL/IRBB) :

Les lignées quasi-isogéniques possédant différents gènes de résistance aux maladies majeures et aux insectes peuvent être utiles pour identifier les races et les biotypes de maladies et d'insectes, ainsi que de nouveaux gènes de résistance. De plus, elles peuvent servir de donneurs de résistance dans les programmes de sélection et constituer un excellent matériel pour l'étude des mécanismes de la résistance. Cependant, encore en 1979, les cultivars de riz et les races bactériennes utilisées comme différentiels au Japon et aux Philippines étaient différents, les équipes de recherche des deux pays avaient du mal à distinguer les gènes de résistance. Il était alors important de mettre en place une base commune définissant la relation entre les races bactériennes et la résistance des cultivars de riz. Pour établir une base commune de recherche sur la résistance au BB et harmoniser la caractérisation des races, les équipes des deux pays ont développé dans le cadre d'une collaboration internationale, des lignées quasi isogéniques (NILS) contenant divers gènes de résistance (Ogawa et al. 1988).

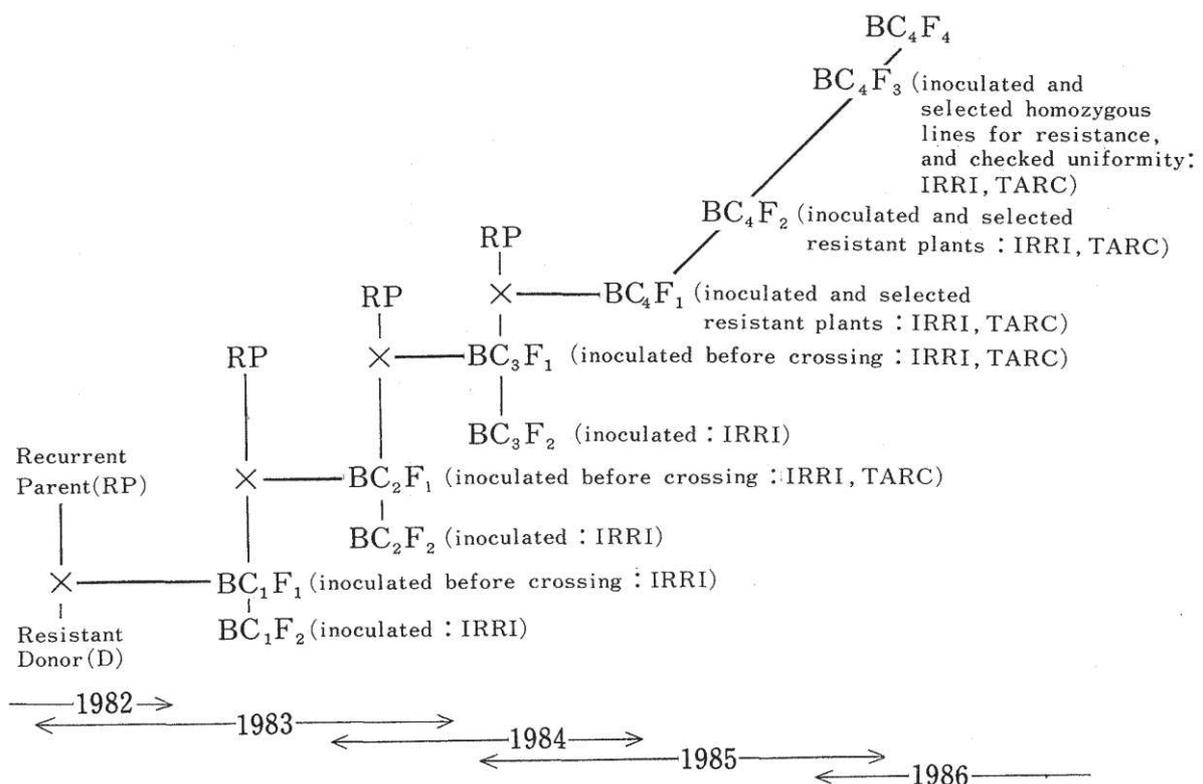


Figure 3: Les différentes étapes de la sélection des lignées quasi-isogéniques pour la résistance au flétrissement bactérien (IRBB), Source : (Ogawa 1991).

Tableau 2: Liste des IRBB utilisés comme différentiel international et proposé pour la caractérisation des races de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

DIFFERENTIELS	ECOTYPE	GENES DE RESISTANCE
IR24	Indica	<i>Xa-18</i>
IR BB 1	Indica	<i>Xa-1</i>
IR BB 2	Indica	<i>Xa-2</i>
IR BB 3	Indica	<i>Xa-3</i>
IR BB 4	Indica	<i>Xa-4</i>
IR BB 5	Indica	<i>xa-5</i>
IR BB 7	Indica	<i>Xa-7</i>
IR BB 8	Indica	<i>xa-8</i>
IR BB 10	Indica	<i>Xa-10</i>
IR BB 11	Indica	<i>Xa-11</i>
IR BB13	Indica	<i>xa-13</i>
IR BB 14	Indica	<i>Xa-14</i>
IR BB 21	Indica	<i>Xa-21</i>

Source: D'après Ogawa 1993.

La première série de NILS de type IRBB (tableau 2) a été ainsi développée pour servir de différentiels internationaux aux souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et comme testeurs pour identifier de nouveaux gènes de résistance au flétrissement bactérien du riz (T Ogawa and Yamamoto 1987). Ces lignées ont été développées dans le fonds génétique IR24 qui est le parent récurrent des IRBB. Il est recommandé d'utiliser ces lignées (tableau 2) pour caractériser et surveiller la distribution des races de *X. oryzae* pv. *oryzae*. En utilisant ces lignées, la plupart des races pourraient être identifiées et les gènes de résistance les plus efficaces identifiés et préconisés dans chaque pays ou agrosystème rizicole à l'échelle du territoire. Les semences sont envoyées aux scientifiques sur demande auprès de l'IRRI, et nombreux sont les articles scientifiques publiés dans lesquels ces lignées IRBB sont utilisées.

La méthode pour l'identification de nouveaux gènes de résistance a été décrite en 5 étapes (Tsugufumi Ogawa 1993). La procédure de sélection des lignées quasi isogénique est schématisée dans la figure 3 (Ogawa et al. 1991; Ogawa 1993; Ogawa et Yamamoto 1987). Les donneurs portant les gènes de résistance connus (D) ont été croisés avec la variété IR24 (RP) (Figure 3). Les hybrides ont été rétrocroisés au moins 4 fois en utilisant IR24 en tant que parent récurrent. Le parent récurrent a été sélectionné sur la base de sa sensibilité à toutes les races de *X. oryzae* pv. *oryzae* connues et répertoriées au Japon et aux Philippines. (Ogawa 1993).

Ainsi, dans la génération BC4F4, chaque lignée a reçu le nom IR-BB comme lignée quasi-isogénique de résistance au flétrissement bactérien (bacterial blight (BB) en anglais). Les chiffres associés au nom font référence au numéro attribué à chaque gène de résistance introgressé dans le parent récurrent (Tableau 2).

#### 1.4. Les populations MAGIC du riz:

Quatre populations multi-parents (MAGIC pour Multi-parent advanced generation inter-cross) ont été développées chez le riz, MAGIC indica (8 parents indica); MAGIC plus (8 parents Indica avec deux générations supplémentaires d'inter-croisement de F1 à 8 voies); MAGIC japonica (8 parents japonica); et MAGIC Global (16 parents - 8 indica et 8 japonica). L'approche méthodologique de la sélection de ces populations est schématisée dans la figure 4 (Bandillo et al. 2013). Les parents utilisés pour la création de ces populations sont des variétés améliorées présentant des caractéristiques d'intérêt agronomiques pour la tolérance aux stress biotiques et abiotiques, le rendement et la qualité des grains. La population MAGIC indica est la plus avancée des populations MAGIC développées à ce jour et comprend 1328 lignes produites par descendance de graines (SSD). Le développement de ces populations a permis d'affiner la cartographie des QTL pour des caractères multiples. Ces lignées hautement recombinées peuvent être également utilisées dans les programmes de sélection. De nos jours, sur la base de l'utilisation de ces populations, la cartographie d'association à l'échelle du génome a permis d'identifier plusieurs gènes majeurs et QTL connus, notamment, le gène Sub1 associé à la tolérance à la submersion, Xa4 et xa5 associés à la résistance au flétrissement bactérien (Bandillo et al. 2013). Les analyses de GWAS ont également permis d'identifier des loci potentiellement nouveaux associés à des caractères essentiels pour l'amélioration du riz. Des essais multi-environnements (MET) ont été inclus dans les programmes de sélection des populations MAGIC en ciblant des environnements irrigués et pluviaux sur des sites aux Philippines et en Tanzanie. Sur la base du rendement et des performances agronomiques de trois sites aux Philippines (Iloilo, Bukidnon et IRRI), 130 lignées ont été sélectionnées et incluses dans un plus large MET aux Philippines, Vietnam, Cambodge, Myanmar, Chine, Thaïlande, Tanzanie et Sénégal. Les sélectionneurs ont choisi des lignées adaptées à leur environnement.

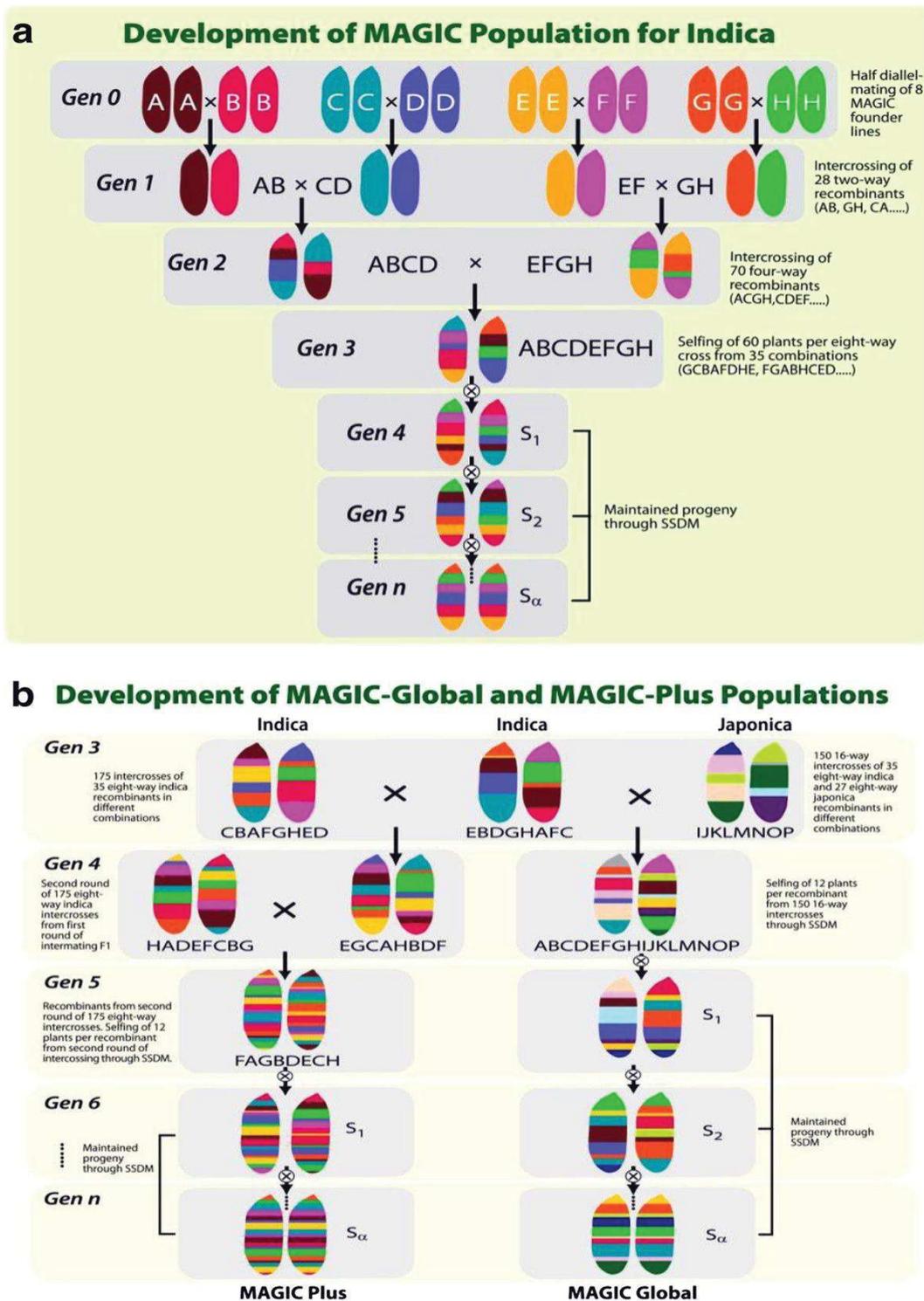


Figure 4: Schéma de croisement pour la réalisation de quatre populations de riz MAGIC. (a): Développement de la population MAGIC indica. Le même schéma a été utilisé pour le développement de la population MAGIC japonica (b): Développement des populations MAGIC plus et MAGIC globale. La population globale comprend huit lignées parentales indica et huit japonica, porteuses de QTL conférant une tolérance aux stress biotiques et abiotiques. A, B, C, D, E, F, G et H - représentent les 8 parents indica; I, J, K, L, M, N, O et P - représentent les 8 parents japonica; Génération Gen; SSDM - méthode de descendance à une seule graine, S-selfing. Source: (Bandillo et al. 2013)

## 1.5. Le nouveau riz pour l’Afrique, les lignées NERICA :

Le terme NERICA signifie nouveau riz pour l’Afrique « New Rice for Africa », une famille élargie de quelque 3 000 lignées. Les lignées NERICA ont été développées par l’utilisation de la technique de récupération d’embryons issus de croisements interspécifiques entre *Oryza glaberrima* Steud et *O. sativa* L. suivis de rétrocroisements successifs avec le parent *sativa* (Jones et al. 1997; Jones et al. 1998). La lignée hérite ainsi des caractéristiques d’intérêt agronomiques et désirées des deux espèces. En effet, la lignée conserve la caractéristique de productivité du parent *sativa* et de l’adaptation au milieu de culture, et du parent *glaberrima* celles de la tolérance aux maladies et aux insectes, de la teneur élevée en protéines et d’un meilleur goût. Sa culture est peu couteuse, moins exigeante en intrants et parfaitement adaptée à l’écologie des hautes terres pluviales de l’Afrique subsaharienne (SSA). Différents programmes d’amélioration des états de SSA l’ont diffusé à grande échelle. La première génération de variétés NERICA 1 à 11, y compris la descendance WAB450, a été développée dans les années 1995 à partir de croisements entre deux variétés d’écosystème pluvial, notamment CG14 (*O. glaberrima* Steud) originaire du Sénégal et WAB56-104, appartenant à la sous-espèce *japonica* de *O. sativa* L, une variété améliorée des hautes terres. En revanche, les NERICA 12 à 18 sont issus de deux séries de croisements, utilisant le même parent *O. glaberrima* (CG 14) mais deux parents *O. sativa* différents (WAB56-50 et WAB181-18). Morphologiquement variés, génétiquement stables et entièrement fertiles, ces descendants interspécifiques ont été mis au point soit par la sélection conventionnelle, soit par l'utilisation de techniques de culture d'anthers et de double haploïdisation spécialement développées pour vaincre la stérilité et accélérer le processus de sélection. Le développement de NERICA de bas-fonds irrigués et non irrigués provenant de croisements entre les espèces *glaberrima* et *sativa* (sous-espèce *indica*) a été lancé en 2000 (ADRAO, 2000). Parmi les centaines de lignées interspécifiques développées, 60 ont été particulièrement plébiscitées par les agriculteurs de plusieurs pays grâce au processus de sélection participative des variétés, une approche utilisée avec succès pour accélérer la diffusion des variétés NERICA. En 2006, ces lignées ont été nommées le nouveau riz pour les basses terres d’Afrique (NERICA-L) « pour New Rice for African Lowlands en anglais », dont plusieurs ont été diffusées au Burkina Faso, au Mali, au Togo, en Sierra Leone, au Niger et au Cameroun. [http://www.africarice.org/publications/nerica-comp/module%202\\_Low.pdf](http://www.africarice.org/publications/nerica-comp/module%202_Low.pdf)

## 2. Le Riz au Mali :

### 2.1. Le statut du riz dans la politique agricole nationale:

Le riz est consommé dans tout le pays. Selon la direction nationale de la statistique (DNSI), chaque habitant consomme en moyenne 57,24 kg de riz par an. La préférence dans la consommation céréalière est accordée au riz local dont le prix fixe celui du marché national. Cet environnement favorable est d’autant plus important qu’il donne de la valeur aux efforts

des producteurs tout en créant des emplois, contribuant ainsi à maintenir les populations dans les zones rurales. L'augmentation de la population dans les zones urbaines due à l'exode rural et à l'urbanisation qui en résulte a fortement influencé la consommation de riz, avec une augmentation annuelle moyenne de 7,5% depuis 1995. La production attendue en 2018 est de 3 969 564 tonnes de paddy à partir de 245 420 ha de riziculture pluviale, 220 673 ha de maîtrise totale d'eau et de 621 161 ha de submersion libre dans le delta. L'objectif à ce stade est de faire du Mali un exportateur de riz avec 1,5 million de tonnes de riz commercialisable à l'extérieur

[https://www.jica.go.jp/english/our\\_work/thematic\\_issues/agricultural/pdf/mali\\_fr.pdf](https://www.jica.go.jp/english/our_work/thematic_issues/agricultural/pdf/mali_fr.pdf)

## 2.2. Types de riziculture:

La riziculture peut être classée en deux grands systèmes au Mali:

- ✓ La riziculture dans les systèmes de gestion d'eau consolidée sur la base du degré de maîtrise de l'eau d'irrigation; la riziculture par inondation contrôlée / riziculture marécageuse (notamment dans les régions autour de Ségou et Mopti); riziculture utilisant le contrôle total de l'eau dans les rizières de l'Office du Niger, périmètres irrigués de Sélingué, Banguinéda et les petits périmètres irrigués des fleuves Niger (Mopti, Tombouctou et Gao) et Sénégal (Kayes, Kita, Bafoulabé et Manantali) (Figure 4).
- ✓ La riziculture traditionnelle comprenant les plaines naturelles inondables ou marécageuses dans le delta central du Niger, la riziculture dans les basses terres et dans les plaines inondées à la pointe sud du pays, ainsi que la riziculture pluviale dans les régions de Sikasso, Kayes, Koulikoro et certaines parties de la région de Ségou (Figure 5).

Dans sa politique de maîtrise de l'eau, l'État a mis un accent particulier sur les installations hydro-agricoles afin que les exploitations agricoles soient moins affectées par les aléas climatiques. Les zones prioritaires sont celles où le contrôle total de l'eau est possible et peut être exécuté avec des coûts minimaux. Les différents types de riziculture peuvent ainsi être classés par ordre de priorité en fonction du potentiel de production national :

### 2.2.1. Riziculture irriguée avec maîtrise totale de l'eau :

Dans ce type de riziculture, les exploitations sont construites pour permettre un contrôle total de l'eau au niveau de la parcelle, c'est-à-dire un contrôle de l'irrigation et du drainage (entrée et sortie de l'eau dans les exploitations). De plus, les pratiques culturales sont passées d'un système extensif à un système intensif avec transplantation du riz et double culture. L'Office du Niger constitue la plus grande zone prioritaire avec son potentiel de 900 000 ha de terres irriguables, dont 90 000 ha seulement sont actuellement développés. Par ailleurs, il existe de grands projets développés à Selingue, Banguinéda, les plaines de San

Ouest et les petites exploitations villageoises situées le long des fleuves Niger et Sénégal. La superficie totale développée est de 125 000 ha et les rendements obtenus varient entre 6 et 10 tonnes / ha. De nouveaux développements devraient être réalisés dans la zone couverte par l'Office du Niger. Ils comprennent des zones allouées au Millennium Challenge (16 000 ha), au programme libyen (100 000 ha) et à l'UEMOA (5 000 ha).

#### 2.2.2. Riziculture pluviale, NERICA :

Cela a été pratiqué jusqu'à récemment dans une petite zone du sud du pays où les précipitations sont souvent supérieures à 800 mm par an. Les rendements sont généralement faibles, autour de 800 kg / ha. Cependant, avec l'avènement du projet NERICA Rice, ce type de riziculture commence à prendre une nouvelle dimension dans les zones autour de Sikasso, Kayes et Koulikoro (Figure 6), où l'on enregistre des rendements variant entre 3 et 3,5 tonnes / ha.

#### 2.2.3. Riziculture en submersion contrôlée :

Ce type de riziculture repose généralement sur une approche basée sur un canal qui tire l'eau de la rivière, une vanne de contrôle et une digue partielle ou complète entourant la zone irriguée. L'inondation (entrée d'eau dans le périmètre) est contrôlée. Le semis du riz est effectué sous un système pluviométrique au début de la saison des pluies, lorsque le niveau de la rivière augmente suffisamment pour permettre à l'eau de pénétrer dans l'enceinte (périmètre) à travers l'installation, inondant ainsi progressivement les terres. La culture dépend donc des pluies pour l'établissement des cultures et de la disponibilité et du niveau de l'eau pour les inondations contrôlées. La superficie cultivée est d'environ 74 000 ha et se situe essentiellement à Ségou et (Mopti Figure 7). Les rendements varient entre 0,8 et 2,5 t / ha.

#### 2.2.4. Riziculture dans les bas-fonds :

La riziculture dans les basses terres se caractérise par la grande diversité des lieux et des pratiques. Selon le type de plaine et la topographie du champ, le riz est inondé de manière temporaire ou permanente en raison de la montée de la nappe phréatique, de l'accumulation d'eau de ruissellement et du niveau de la rivière ou des marais. Le riz est semé sous un système pluviométrique au début de la saison des pluies avant les inondations. L'eau recule progressivement et disparaît généralement du champ à la récolte. Cette culture dépend fortement des précipitations. La plupart des améliorations sont apportées par la maîtrise de l'eau pour protéger les champs de basse altitude: construction de digues utilisant des courbes de niveau, diguettes de dérivation, travaux de dérivation par réseau d'irrigation, etc. Sur une superficie potentielle de 300 000 hectares, environ 140 000 hectares de riz sont cultivés

chaque année dans les bas-fonds non aménagés, principalement par les femmes des régions de Ségou, Sikasso et Kayes (Figure 8), où les rendements varient entre 0,8 et 2 t / ha.

#### 2.2.5. Culture traditionnelle en submersion libre, riz flottant :

Cela se pratique dans le delta intérieur du Niger et le long de la boucle de la rivière. Les variétés utilisées sont de types *glaberrima* et se caractérisent par une croissance rapide qui leur permet de suivre le niveau de la rivière qui peut atteindre 5 cm par jour. La plantation a lieu pendant la saison des pluies avant l'arrivée des eaux pour inonder les rizières. L'eau peut monter de plusieurs mètres ici et là et le riz pousse de telle sorte que seules les panicules apparaissent au-dessus de l'eau (d'où le nom de riz flottant). La récolte se fait principalement à l'aide de pirogues et les rendements dépassent rarement 1 t / ha sur une superficie totale d'environ 300 000 ha.

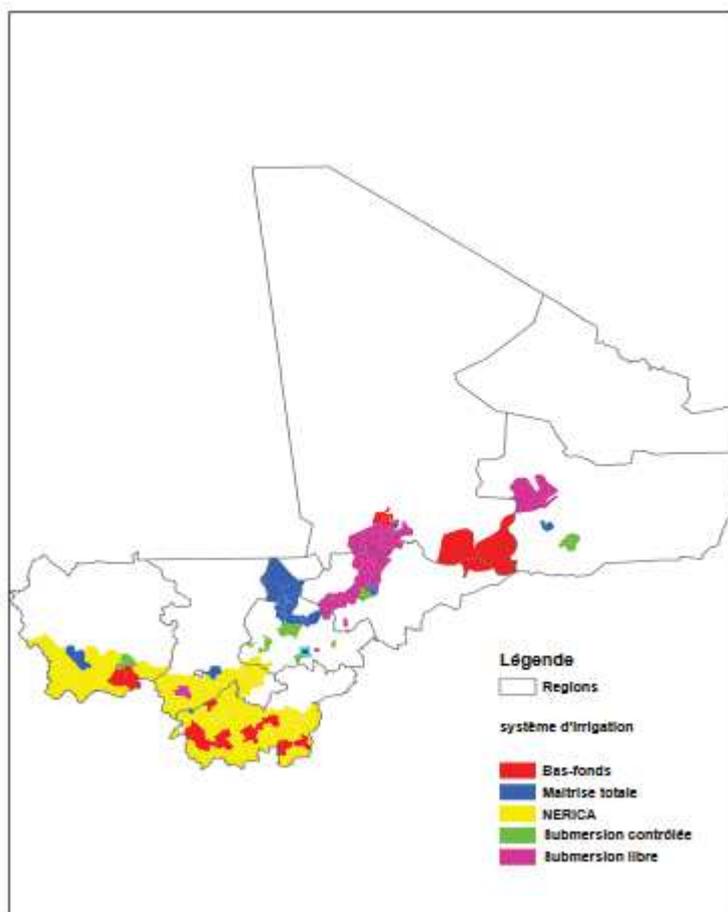


Figure 5: Distribution géographique des systèmes de riziculture au Mali. Les types de riziculture sont affichés en fonction des différentes couleurs dont l'ensemble constitue les principaux sites de production du pays. NERICA (jaune) est mis pour la riziculture pluviale. Source : <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/Mli170029.pdf>, Stratégie nationale de développement de la riziculture.

### 2.3. Ressources phytogénétiques :

Les activités de prospection, de collecte, de caractérisation, d'évaluation des écotypes locaux et leur conservation sont assurées par l'Unité des ressources génétiques de l'Institut d'Economie Rural (IER), en particulier pour le riz pluvial et dans les exploitations agricoles pour les variétés de *glaberrima*. La collecte de variétés de riz irriguées est assurée par le programme de riz irrigué. De plus, l'introduction de variétés et de lignées prometteuses est réalisée à travers les réseaux ou par le biais d'institutions de recherche sous régionales ou internationales (Africa rice, IRRI). Il existe une vaste collection de variétés de riz irriguées à Kongoni (Région de Ségou, dans la zone Office du Niger, latitude : 14° 44' 3,5" nord, longitude : 6° 1' 45,8" ouest, altitude : 276 mètres), avec 2218 accessions de l'espèce *sativa* L., comprenant des groupes d'*indica*, *japonica* et *javanica*. La collecte de *glaberrima* a également été réalisée et cette recherche a abouti à la mise au point de variétés locales améliorées. Après des tests de performance satisfaisants au niveau des parcelles d'expérimentation, les nouvelles variétés créées sont soumises au laboratoire des semences pour enregistrement dans le catalogue national.

### 2.4. Importance du riz dans l'économie nationale :

Selon la division de la production végétale et de la protection des plantes (AGP) de la FAO en collaboration avec le bureau sous régional de la FAO pour l'Afrique de l'Ouest, le Mali est de nos jours le deuxième pays producteur de riz dans l'espace CDEAO après le Nigeria. Sa production moyenne sur la dernière décennie est de 2,2 millions de tonne de riz paddy par an avec une prévision avoisinant 3 millions de tonne en 2018 contre 7,2 millions au Nigeria (FAO, 2018). L'augmentation de la production rizicole au cours des 10 dernières années est associée à la libéralisation de la filière rizicole, l'accroissement des aménagements hydro-agricoles, l'adoption de nouvelles technologies et la réhabilitation de la zone Office du Niger qui assure plus de la moitié de la production nationale. Cependant, le Mali reste un pays importateur de riz pour la couverture de ses besoins alimentaires nationaux. L'importation atteint 45% du besoin national de consommation.

### 2.5. Les contraintes de la riziculture au Mali :

Le Mali a de très grandes potentialités en eaux d'irrigation et des terres rizicultivables qui en ont toujours fait le « grenier à riz » potentiel de la sous-région ouest d'Afrique. A présent, moins de 20% ont été mises en valeur et le pays continue d'importer des quantités importantes de riz. Selon la FAO, la riziculture au Mali est confrontée à des difficultés surmontables, notamment, le faible niveau d'utilisation de variétés et de pratiques culturales améliorées et performantes, une maîtrise insuffisante des techniques culturales par les producteurs, la vétusté, l'insuffisance ou l'inadaptation des équipements, des matériels et des

infrastructures, une insuffisance d'encadrement des producteurs, des difficultés d'accès au crédit, des difficultés d'accès aux semences de qualité et aux engrais minéraux, des circuits de distribution et de commercialisation peu performants, une insuffisance organisationnelle des acteurs au niveau des associations paysannes (APS), des fermes privées, des entreprises, des associations et des coopératives

[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/spid/docs/Mali/Riziculture\\_etatdeslieux\\_ML.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/spid/docs/Mali/Riziculture_etatdeslieux_ML.pdf) .

#### 2.5.1. Les contraintes biotiques:

La productivité du riz au Mali est également affectée par des contraintes biotiques parmi lesquelles, les adventices, les insectes et différentes maladies dont les plus connues et les plus sévères sont fongiques (Pyriculariose), virales (panachure jaune du riz) et bactériennes (bactérioses: flétrissement bactérien et strie foliaire).

##### 2.5.1.1. La pyriculariose:

La pyriculariose est causée par un champignon *Pyricularia oryzae*, encore appelé *Magnaporthe oryzae* (Pinta et al. 2013). En fonction des organes attaqués, il existe la pyriculariose foliaire, la pyriculariose du cou (pourrissement de la base des panicules) et la pyriculariose des nœuds. La maladie se propage par des spores, au niveau des feuilles, des épis et dans les tissus où elle laisse apparaître des symptômes. Les symptômes foliaires sont des lésions ovales, à centre gris entouré d'un liséré brun à rouge sombre. Elle se caractérise par l'absence de la chlorophylle sur les segments attaqués, affectant ainsi considérablement le rendement dont les pertes sont très variables en fonction des agrosystèmes. Ces pertes peuvent atteindre 100 % dans certaines conditions environnementales et pratiques culturales (Vera Cruz et al. 2007). En effet, une dose importante d'azote (Talbot, 2003), et une hygrométrie de l'air très élevée favorisent le développement de la maladie (Wopereis et al. 2008). Plus de quatre-vingt gènes de résistance à la pyriculariose ont été identifiés dont 21 ont été clonés et utilisés pour l'amélioration de certaines variétés de riz pour la résistance (Jia et al. 2009).

<http://www.africanrice.org/publications/PLAR/techmanual-fr/reference24.pdf>

##### 2.5.1.2. La panachure jaune du riz :

La panachure jaune du riz (*rice yellow mottle virus, RYMV*) est une virose sévère et endémique à l'Afrique. Elle a été signalée pour la première fois en 1966 au Kenya (Abubakar et al. 2003 ; Kouassi et al. 2005). Un simple toucher des plantes malades avant les saines peut entraîner une nouvelle infection. Dans les conditions naturelles, le RYMV est transmis d'une plante à une autre par des insectes vecteurs dont les plus répandus sont des coléoptères: *Sesselia pusilla*, *Chaetocnema* spp, *Aulacophora africana*, *Trichispa sericea* et *Di cladispa viridicynea*. Le symptôme le plus apparent est un jaunissement qui débute par une alternance

de plages jaunes et vertes donnant un aspect marbré aux feuilles. Les principaux symptômes de cette virose sont : le rabougrissement, la réduction du tallage, la bigarrure foliaire par des stries jaunâtres, et la stérilité. C'est une contrainte majeure pour la production du riz dans les systèmes de bas-fonds irrigués ou pluviaux (Soko et al. 2010). Les pertes de rendement associées au RYMV en condition irriguée des régions sahéliennes et tropicales humides varient de 58 à 68 % au Niger (Basso et al. 2001), et 64 à 100 % au Mali (Soko et al. 2010). La base génétique de la résistance du riz a été étudiée (Ndjondjop *et al.* 1999). Plusieurs QTL et 3 gènes de résistance, RYMV1, RYMV2, RYMV3 ont été identifiés (Pidon et al. 2017). RYMV1 est déjà déployé dans la riziculture par sélection assistée par marqueurs (Albar *et al.* 2006 ; Boissard *et al.* 2007 ; Thiémélé *et al.* 2010 ; Pidon et al. 2017). Malgré ces efforts, depuis deux ans, lors de nos missions de sortie dans le cadre du suivi évaluation des maladies bactériennes du riz, nous avons observé la réapparition de la panachure jaune du riz dans les périmètres irrigués de l'office du Niger. Il est donc urgent de développer les voies et moyens pour trouver les sources à large spectre de résistance pour un contrôle efficace de la maladie.

#### 1.5.1.3. Le flétrissement bactérien et la strie foliaire du riz :

La bactériose vasculaire (BB) et à stries foliaires translucides (BLS) sont deux maladies bactériennes importantes du riz causées respectivement par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) et *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). Si le flétrissement bactérien est une maladie hautement dévastatrice de la culture du riz partout dans le monde, la strie foliaire est quant à elle, une maladie émergente signalée pour la première fois au Mali dans les années 2010 (Gonzalez et al. 2007). Le flétrissement bactérien (BB) est la troisième maladie majeure du riz en Afrique de l'Ouest et a été signalé pour la première fois au Mali dans les années 1979 dans les périmètres rizicoles de l'Office du Niger (Buddenhagen et al. 1979). Elle provoque sur les feuilles des stries transparentes, très visibles à la lumière ; plus tard ces lésions se dessèchent et deviennent brunes et opaques. Dans les épidémies sévères, l'ensemble de la parcelle donne l'image d'une brûlure. L'apparition et la dissémination de ces deux maladies, sont favorisées par le vent, les orages ou par une nutrition minérale déséquilibrée.

Les deux pathovars (*Xoo* et *Xoc*) présentent plus de 85% d'homologie de leurs génomes, mais se distinguent par des caractéristiques phénotypiques (Vera Cruz et al. 1984; Vauterin et al. 1995; Ochiai et Kaku, 1999). La meilleure approche pour leur contrôle est la résistance variétale. Il existe une quarantaine de gènes de résistance contre le flétrissement bactérien en Asie. Contre l'agent de la strie foliaire (*Xoc*), un seul transgène gène RXo1 isolé du maïs est identifié à ce jour. Plusieurs gènes de résistance à *Xoo* sont clonés et déployés dans les périmètres rizicoles en Asie, cependant, aucun de ces gènes n'est déployé en Afrique à ce jour et au Mali en particulier. Leur efficacité vis-à-vis des souches de *Xoo* au Mali n'est pas inconnue

## II. Les maladies bactériennes du riz causées par les *Xanthomonas oryzae* :

Les bactéries responsables du BB et BLS sont du Phylum des *Proteobacteria*, de la classe des *Gammaproteobacteria*, de l'ordre des *Xanthomonadales*, de la famille des *Xanthomonadaceae*, du genre *Xanthomonas* et de l'espèce *Xanthomonas oryzae*. L'espèce *Xanthomonas oryzae* (*Xo*) comprend deux pathovars, à savoir *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) qui se différencient par leur mode d'infection de l'hôte et leur spécificité tissulaire. Ces agents pathogènes bactériens sont des organismes étroitement apparentés et ont été précédemment nommés pathovars *Xanthomonas campestris* (Swings et al. 1990; EPPO, 2007). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) est un pathogène vasculaire causant le flétrissement bactérien du riz, en anglais, Bacterial leaf blight (BB). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) est l'agent causal de la strie foliaire, aussi appelé Bacterial leaf streak (BLS). Chacune des deux maladies est reconnaissable par ses symptômes sur le riz.

### 2.1. Distribution géographique du BB et BLS :

Le flétrissement bactérien du riz a été signalé pour la première fois en 1884 dans la province de Fukuoka, au sud du Japon, (Mew, 1988). Cette maladie est considérée comme l'une des maladies du riz les plus graves au monde, bien qu'elle soit contrôlée au Japon depuis les années 1970. Elle est de nos jours répandue dans tous les pays rizicoles tropicaux à l'exception de l'Europe qui est à présent le seul continent épargné dans ses périmètres rizicoles par cette maladie EPPO (2018). La maladie a été signalée en Asie du Sud-Est au début des années 1960, où elle est encore largement répandue et affecte la production rizicole (Goto, 1992). La maladie est signalée dans plusieurs pays d'Afrique (Benin, Burkina Faso, Burundi, Cameroun, Gabon, Mali, Niger, Sénégal, Togo, Uganda), en Asie (Bangladesh, Cambodge, Chine, Inde, Indonésie, Iran, Japon, Coré, Lao, Malaisie, Myanmar, Népal, Pakistan, Philippines, Sri Lanka, Taiwan, Thaïlande, Viet Nam), en Océanie (Australie), en Amérique (Bolivie, Costa Rica, Equateur, Salvador, Honduras, Mexico, Panama, Louisiane, Texas, Venezuela) (Figure 6) EPPO (2018).

La strie foliaire du riz a été décrite pour la première fois en 1918 aux Philippines (Ou, 1972). Elle est présente dans plusieurs autres pays d'Asie (Bangladesh, Cambodge, Chine, Inde, Indonésie, Lao, Malaisie, Myanmar, Népal, Pakistan, Philippines, Taiwan, Viet Nam), en Afrique (Burkina Faso, Burundi, Kenya, Madagascar, Mali, Nigeria, Sénégal, Uganda) et en Océanie (Australie) (Figure 9). La riziculture Européenne et Américaine ne sont pas touchées par cette maladie (Figure 10). En effet *X. oryzae* pv. *oryzae* et *X. oryzae* pv. *oryzicola* sont des agents de quarantaine aux Etats Unis et dans les pays où ils ne sont pas endémiques, également dans les pays où ils sont présents afin de limiter l'introduction de nouvelles souches virulentes.

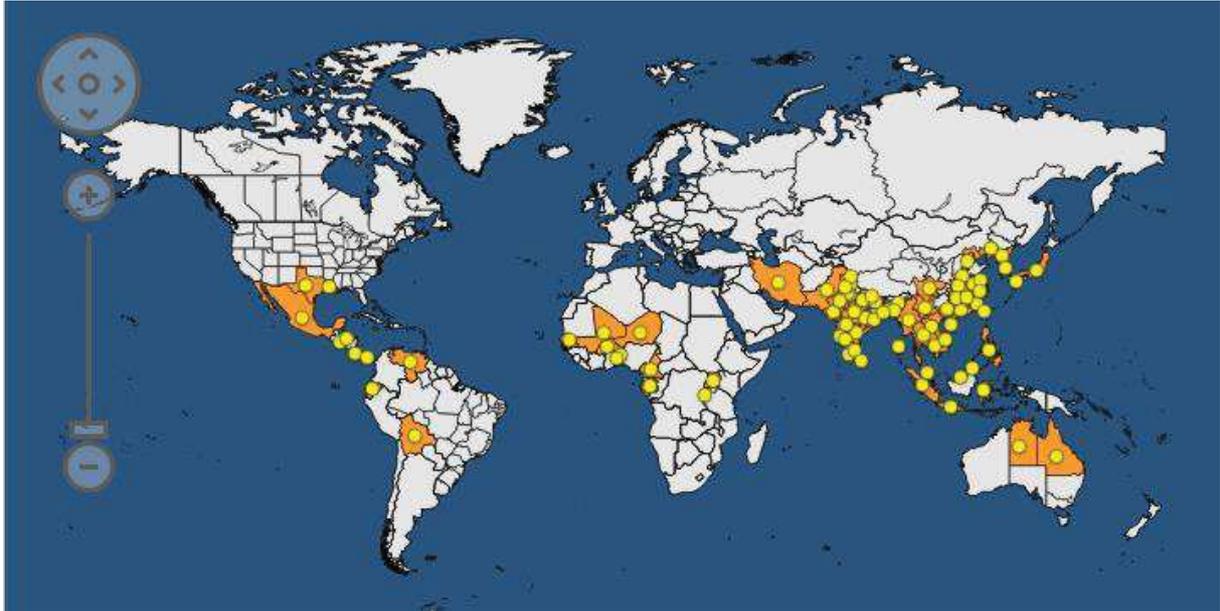


Figure 6: Distribution géographique mondiale de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Les points jaunes représentent les pays qui ont enregistré la présence de Xoo sur le riz. Source : EPPO (2018) EPPO Global Database (available online). <https://qd.eppo.int>

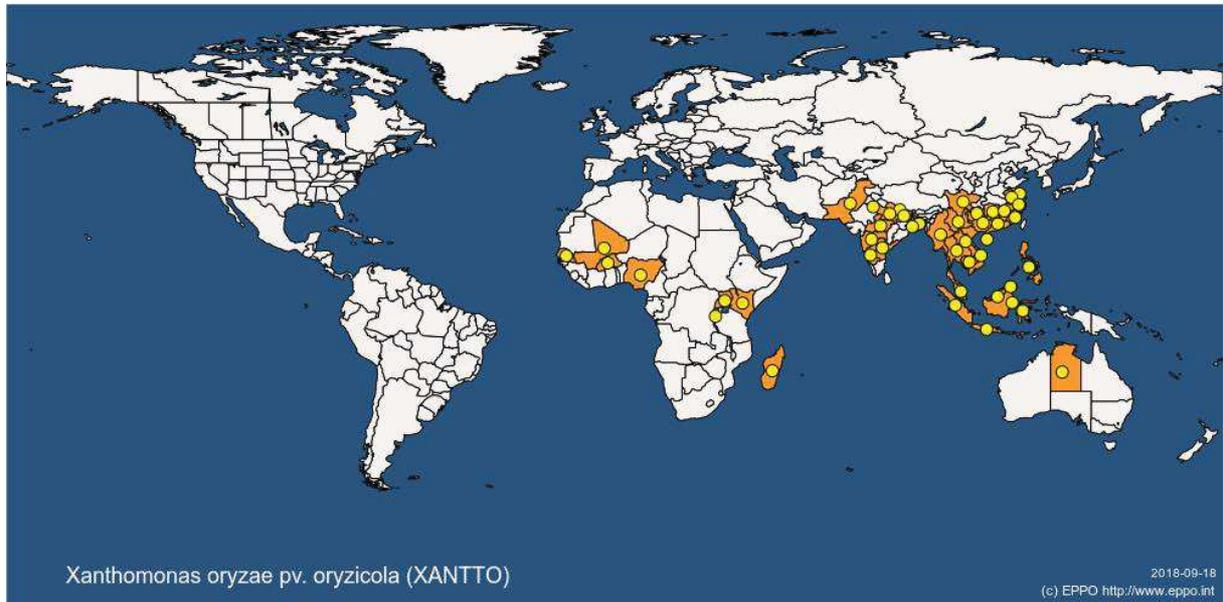


Figure 7: Distribution géographique mondiale de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc). Les points jaunes indiquent les pays qui ont enregistré la présence de Xoc sur le riz. Source : EPPO (2018) EPPO Global Database (available online). <https://qd.eppo.int>

## 2.2. Modes d'infection, symptômes et épidémiologie des bactérioses causées par *X. oryzae* :

### 2.2.1. Le flétrissement bactérien du riz:

*X. oryzae* pv. *oryzae* entre dans le riz par les blessures et les hydathodes pour causer la maladie. Cependant, les hydathodes pourraient constituer l'une des multiples couches immunitaires des plantes contre les agents pathogènes vasculaires tels que *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Russell, 1898; Hugouvieux et al. 1998; Nino-Liu et al. 2006; Bhat et al. 2010). Cette immunité post invasive des plantes à hydathodes est supprimée par les systèmes de sécrétion de type III de la bactérie et le dialogue moléculaire qui s'en suit entre les cellules végétales et les bactéries à hydathodes détermine le résultat de l'interaction (Cerutti et al. 2017). Malgré ses réponses immunitaires contre certains phytopathogènes, les hydathodes ne semblent pas être des environnements aussi hostiles et les bactéries atteignent rapidement une croissance assez importante dans cette niche ( $10^5$  cfu / hydathode) où l'eau et les nutriments sont abondants. En effet, l'épithème est continuellement perfusé avec de la sève fraîche composée de quantités de nutriments rares et stables. Ainsi, les bactéries qui sont à la surface de la feuille se retrouvent en suspension dans le liquide de guttation qui se forme au niveau des hydathodes au fur et à mesure de son apparition pendant la nuit puis pénètrent dans les tissus par mobilité flagellaire. Ce peut être de manière passive lorsque le fluide de guttation pénètre dans la feuille le matin (Curtis 1943). Les bactéries se multiplient dans les espaces intercellulaires de l'épithème sous-jacent à la cavité de l'hydathode, puis pénètrent dans la plante et se propagent à travers le xylème (Figure 8 e) (Noda et Kaku, 1999).

Ces pathogènes causent trois types de symptômes (Veena et al. 2000), notamment, la brûlure des feuilles (leaf blight) (Figure 8 a), le flétrissement (kresek ou wilt) et le jaunissement (jaune pâle) des feuilles (pale yellow). La brûlure des feuilles se caractérise par des lésions allongées et ondulées qui se développent le long des nervures des feuilles. Ces lésions peuvent se développer sur un ou les deux côtés de la feuille et parfois sur la nervure médiane, et les symptômes apparaissent en général à partir du stade de tallage maximal. Dans les jeunes lésions, des gouttes de suintement bactérien peuvent être observées tôt le matin. Sur les panicules, les symptômes sont des lésions grises à brun pâle sur les glumes, entraînant une infertilité et une faible qualité des grains. Le flétrissement ou Kresek est l'expression d'une infection systémique sur les jeunes plants pendant le tallage et intervient surtout sur des variétés sensibles. Les feuilles infectées flétrissent, roulent, virent au gris-vert, ce qui entraîne la mort des plants. Le jaunissement des feuilles est également associé à des infections systémiques qui apparaissent au stade du tallage; les plus jeunes feuilles deviennent uniformément jaune pâle ou présentent une large bande jaune. Les bactéries sont localisées dans les entre-nœuds et aux sommets des chaumes atteints, mais pas dans les feuilles elles-mêmes (Ou, 1985; Goto, 1992). A des stades physiologiques plus avancés du riz, il est souvent

difficile de distinguer les deux maladies, flétrissement bactérien et strie foliaire (Nino-Liu et al. 2006).

### 2.2.2. La maladie à stries foliaires translucides :

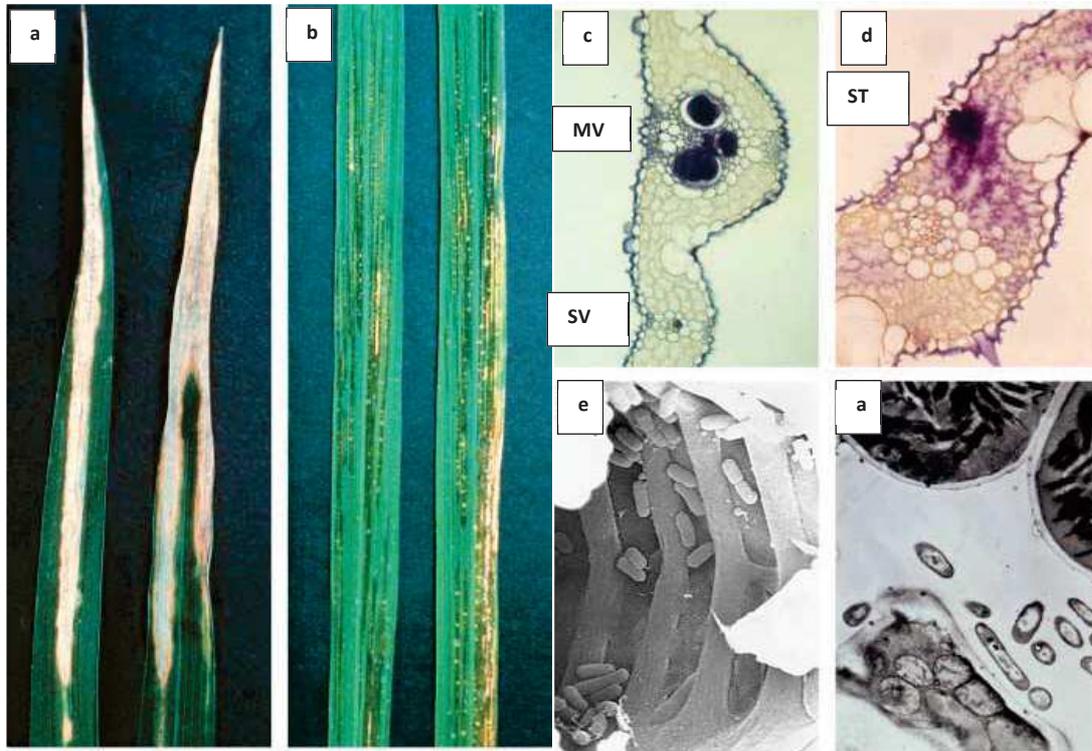


Figure 8: Symptômes et spécificité tissulaire des pathovars de *Xanthomonas oryzae*. (a) Feuilles de riz présentant des lésions bactériennes s'étendant le long des nervures à partir de l'extrémité et des marges des feuilles, résultant de l'invasion du xylème par les hydathodes par *Xoo*. (b) Feuilles de riz présentant des symptômes de stries foliaires causés par la colonisation du tissu interveinal suite de la pénétration de *Xoc* par les stomates. (c) Coupe transversale d'une feuille de riz infectée par *Xoo*, montrant l'emplacement des cellules bactériennes, apparaissant sous forme de bleu foncé à violet dans les vaisseaux du xylème de la nervure centrale (MV) et dans une veine secondaire (SV). (d) Coupe transversale d'une feuille de riz infectée par *Xoc* montrant la colonisation bactérienne de la chambre sous-stomatale et du parenchyme du mésophylle. ST, stomate. (e) Micrographie électronique à balayage de *Xoo* dans un vaisseau du xylème d'une feuille de riz. (f) Micrographie électronique à transmission des cellules de *Xoc* dans les espaces intercellulaires du mésophylle d'une feuille de riz. Photos a and b de T. Mew, à partir de l'ouvrage *Compendium of Rice Diseases*, 1992, American Phytopathological Society, St. Paul, MN. Photos c, d and f de H. Kaku. Photo de J. Leach. Source: (Niño-Liu, Ronald, and Bogdanove 2006)

*X. oryzae* pv. *oryzicola*, pénètre dans la feuille principalement par les stomates, se multiplie dans la cavité stomatale et colonise les espaces intercellulaires du parenchyme (Ou, 1985). *Xoc* peut également infecter la plante par les blessures, mais reste limité à l'apoplaste du mésophylle et n'envahit pas le xylème (Ou, 1985). Les premiers symptômes sont de petites stries transparentes et aqueuses, qui peuvent s'allonger et s'obscurcir. Les exsudats bactériens à la surface des feuilles sont typiques de *Xoc* (Figure 8 b).

A un stade avancé de la maladie, les feuilles deviennent brunes et se fanent (Ou, 1985; Nyvall, 1999). Les symptômes de BB et BLS sont facilement différenciables aux stades précoces de la maladie et reflètent les différents modes d'infection de chaque agent pathogène. En fonction des conditions de culture ou du degré de résistance des cultivars, le BB et le BLS peuvent être confondus entre eux ou également avec des symptômes liés à des troubles physiologiques de la plante. Les deux maladies, BB et BLS peuvent coexister dans les rizières, sur les mêmes plantes et les feuilles pouvant présenter simultanément les symptômes des deux maladies (Niño-Liu, Ronald, et Bogdanove 2006) ; Goto, 1992; Mew et al. 1993). Les conditions climatiques influencent directement ou indirectement la propagation de ces agents pathogènes. Les facteurs climatiques les plus déterminants pour la dissémination des maladies sont l'eau à travers la pluie, l'irrigation et les inondations, l'humidité relative ambiante, le vent et la température avec pour le développement des symptômes, un optimum compris entre 25 et 30° C (Mukoo et al. 1957; Watanabe, 1966). Les hôtes intermédiaires, les débris de plantes infectées, les semences, le vent et les eaux d'irrigation constituent des sources primaires d'inoculum pour les deux pathovars *Xoo* et *Xoc* (Ou, 1985; Mew et al. 1993).

Certes si le riz est le principal hôte des *Xoo* et *Xoc*, ces bactéries infectent aussi un certain nombre de *Poaceae* sauvages ou peu cultivées. La fonction de réservoir d'inoculum de certaines graminées sauvages non hôtes a été rapportée par Murty et Devadath, (1981). Les hôtes naturels de *Xoo* sont: *Cyperus defformis*, *C. rotundus*, *Leersia oryzoides*, *L. oryzoides* var. *japonica*, *L. sayanuka*, *Oryza australiensis*, *O. rufipogon*, *O. coarctata*, *O. jeyporensis*, *O. malampuzhensis*, *O. officinalis*, *O. perennis*, *O. sativa* et *Zizania aquatica* (Bradbury, 1986). D'autres plantes peuvent développer des symptômes suite à une inoculation artificielle par *Xoo* (*Isachne globosa*, *Leersia hexandra*, *O. barthii*, etc) et *Xoc* (*Leersia hexandra*) (Bradbury, 1986). Les hôtes naturels de *Xoc* sont *Oryza australiensis*, *O. sativa*, *O. perennis*, *O. longistaminata*, *O. barthii*, *Zizania aquatica*, *Brachiaria lata*, *Paspalum Vaginatam*, *Pennisetum*, Riz sauvage, mauvaises herbes (Wonni et al. 2014).

### 2.3. Impact économique :

Le flétrissement bactérien du riz est l'une des plus sévères maladies du riz en Asie du sud-est, en particulier depuis la révolution verte ou l'introduction de nouvelles variétés hybrides à haut rendement et l'utilisation massive d'azote ont engendré d'importantes pertes dues au BB (Ray & Sengupta, 1970; Feakin, 1971). Cette maladie est un facteur limitant de la culture irriguée du riz où les pertes peuvent atteindre 20 à 80 % de la production selon le stade de développement de la plante, la situation géographique et les conditions saisonnières (Ou, 1985). En effet, le Japon a enregistré dans les années 1954 des pertes de production atteignant 22 -110 000 t sur des périmètres rizicoles de 90 à 150 000 ha. Aux Philippines, les pertes associées à la maladie étaient de l'ordre de 22,5% en saison humide et de 7,2% en saison sèche chez des cultivars sensibles et de 9,5 et 1,8% respectivement chez des cultivars résistants (Exconde, 1973). En Inde, des pertes de rendement variant entre 30 et 43% ont été décrites (Rajarajeswari and Muralidharan, 2006). Au Pakistan, les pertes de rendement

enregistrées entre 2012 et 2013 variaient de 12 à 16% en fonction des régions et de la période de culture (Khan et al. 2015). Les pertes sont généralement moins importantes dans des sols moins fertiles et durant la période rizicole d'été (décembre-avril).

En Afrique, les pertes de rendement ne sont pas bien quantifiées alors qu'une forte incidence de la maladie a été signalée au Burkina Faso, Mali et Niger (Verdier et al. 2003). En effet, au Mali, l'incidence de la maladie varie d'une région à une autre et évolue avec le temps. Des pertes de rendement atteignant 80%, associées au flétrissement bactérien ont été décrites (Sarra et al. 2010). Dans les années 1998, la maladie a provoqué 50% de dégâts dans la plaine rizicole de Bagré au Burkina Faso. Cette perte est été attribuée à l'introduction de la variété chinoise TCS 10 très sensible au BB (Ouédraogo et Kaboré, 1998).

Quant à la strie foliaire du riz, elle cause d'importants dégâts dans certaines régions et sa sévérité est associée aux saisons très humides et l'utilisation de fortes doses d'engrais azotés. En effet, la maladie n'affecte pas la productivité à de faibles doses d'azote. En Inde, des pertes de 5-30% ont été signalées et aux Philippines les pertes restaient peu importantes tant en saison sèche qu'en saison humide (Opina et Exconde, 1971). Ces pertes sont évaluées 20 ans plus tard à 17% sur un cultivar sensible en saison des pluies contre 5,9% en saison sèche (Mew et al. 1992).

#### 2.4. Méthodes de lutte :

Les stratégies de contrôle du flétrissement bactérien (BB) et de la strie foliaire (BLS) doivent être basées sur des méthodes qui permettent d'éviter la variabilité des sources d'inoculum et qui maintiennent au minimum la propagation de la maladie (bactérie) dans les champs (Sawadodo, 2008). Ces mesures de contrôle sont des pratiques culturales, chimiques, biologiques et surtout la résistance variétale du riz basée sur une utilisation raisonnée des gènes de résistance majeur (Tang et al. 2000). En effet, l'incidence de la maladie est moindre si une gestion attentive de la culture du riz (Padmanabhan, 1983) par l'utilisation de cultivars résistants et par le traitement des semences (Singh and Monga, 1985), est pratiquée. Les pratiques culturales tiennent compte du prétraitement des semences avant semis, d'une fertilisation raisonnée en fonction du stade de développement des plantes, de l'espacement adéquat de plantes saines en culture au champ et enfin du désherbage pour réduire le risque de contamination par les eaux d'irrigation et en éliminant les rizières de potentiels hôtes intermédiaires. La lutte chimique repose en général sur la désinfection des semences et un traitement curatif des cultures par des antibiotiques. Il a été en effet proposé d'immerger les plantules de riz dans un antibiotique au moment de la transplantation (Durgapal, 1983). *Xoo* peut être éliminé par trempage des semences pendant 12h dans une solution aqueuse de Ceresan (500 ppm) et d'Agromicine 100 (250 ppm), suivi d'un trempage dans l'eau chaude à 53°C pendant 30 minutes (Shekhawatt et al. 1969 cités par (Agarwal et al. 1994). Depuis que

l'incidence du flétrissement bactérien s'est accrue dans les années 1980, la résistance variétale du riz est devenue un domaine de recherche important. Il existe une littérature abondante sur la sélection et la recherche de résistances à *X.oryzae* pv. *oryzae*.

L'utilisation de variétés résistantes est l'approche la plus utilisée, la plus efficace, économique et respectueuse de l'environnement. Au stade actuel de la recherche sur le riz, plusieurs QTLs et 45 gènes majeurs de résistance ont été caractérisés pour le contrôle de *Xoo* (Vikal and Bhatia 2017; Busungu et al. 2018; Suk-Man Kim 2018). Cependant, la durabilité de ces gènes de résistance peut être affectée par l'évolution rapide des souches bactériennes de *Xoo* ce qui favorise le contournement des défenses induites par un seul gène de résistance majeur (Vera Cruz et al. 2000 Jeung et al. 2006; Kottapalli et al. 2010). L'existence de nombreuses races de *Xoo* rend importante l'obtention d'une résistance durable (Nayak & Chakrabarti, 1986). Ainsi, le pyramidage des gènes de résistance semble conférer une résistance plus stable et durable à *Xoo*. En effet, la pression adaptative nécessaire pour contourner ces résistances est telle que la bactérie n'est pas en mesure d'évoluer dans ce sens sans que cela n'impacte sa « fitness » (Bai et al. 2000; Jeung et al. 2006; Kottapalli et al. 2010). Cette approche de résistance variétale est aussi la méthode la plus réaliste pour le contrôle de la strie foliaire du riz (BLS) dont les souches de *Xoc* portant le gène *avrRxo1* sont contrôlés par le transgène de résistance *Rxo1* isolé du Maïs (Zhao et al. 2005). Par ailleurs, si *avrRxo1* est présent dans toutes les souches *Xoc* d'Asie, son absence est signalée dans un effectif assez important de souches africaines (Zhao et al. 2004 ; Gonzales et al. 2007 ; Hajri et al. 2011 ; Wonni et al. 2014). Ce facteur d'avirulence de type III sécrété par *Xoc*, *AvrRxo1*, est un homologue structural de la famille des sucres-nucléotide kinases zéta toxine qui inhibe la croissance bactérienne. Il phosphoryle le NAD dans les plantes et ses sites catalytiques de la kinase sont nécessaires pour ses phénotypes toxiques et déclencheurs de résistance (Shidore et al. 2017). Un second gène de résistance, *bls1*, récessif, a été identifié et cartographié sur le chromosome 6 du riz DP3 de l'espèce sauvage *Oryza rufipogon* Griff (W. He et al. 2012). De plus, plusieurs QTLs de résistance contre BLS ont été identifiés. Ainsi, Tang et al. (2000) ont identifié 3 QTL conférant la résistance du BLS au riz suite au développement d'une population F2 et d'une population recombinante (RI) impliquant deux parents indica, Acc8558 et H359, respectivement résistants et sensibles au BLS. Un QTL majeur de résistance a été identifié sur le chromosome 11 de la variété de riz Dular (Chen et al. 2006). Il apparaît qu'il serait important de continuer à cribler les différentes populations de riz pour l'identification de nouveaux gènes de résistance à large spectre contre la strie foliaire.

L'OEPP (L'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes) propose d'éviter l'importation de semences de riz originaires de pays infestés (OEPP/EPPO, 1990). Elle recommande, sinon, que ces semences doivent provenir d'une culture saine inspectée pendant la période de végétation, et les semences elles-mêmes doivent être testées avant et après l'importation vis-à-vis des deux pathogènes. Dans tous les pays où ces maladies ne sont pas endémiques telle que la France, une quarantaine est mise en place.

## 2.5. Diversité génétique des souches de *Xanthomonas oryzae* :

### 2.5.1. Historique de *X. oryzae* :

Takashi a observé au Japon en 1909 les souches de *Xoo* dans les gouttes de rosée sur des feuilles de riz portant les symptômes du flétrissement du bactérien. Il a reproduit la maladie en inoculant les feuilles saines de riz avec ces gouttes de rosée. Peu de temps après, son étiologie en tant que maladie bactérienne a été établie et l'agent causal a été isolé et nommé *Bacillus oryzae* (Bokura, 1911, (Mizukami and Wakimoto 1969). La bactérie a été renommée *Pseudomonas oryzae* et plus tard *Xanthomonas oryzae* (Ishiyama, 1922). En 1978, elle a été reclassée et renommée *X. campestris* pv. *oryzae* (DYE 1978). L'agent causal de la strie foliaire a été caractérisé de manière distincte de celui du flétrissement bactérien et porte le nom de *Xanthomonas oryzicola* (Fang et al. 1957, cité par Ou, 1972). Le pathogène a ensuite été renommé *X. translucens* f. sp. *oryzae* puis *X. translucens* f. sp. *oryzicola* et *X. campestris* pv. *oryzicola* (Ou 1985). En 1990, les deux pathovars ont été décrits comme faisant partir d'une nouvelle espèce, *Xanthomonas oryzae*, et ont été renommés *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et *X. oryzae* pv. *oryzicola* .

### 2.5.2. Caractéristiques physiologiques et morphologiques de *X. oryzae* :

L'espèce *X. oryzae* comprend des bactéries à Gram-négatif, en forme de bâtonnet et à extrémité arrondie (Figure 9 a). Les cellules mesurent chacune environ 0,7  $\mu\text{m}$  à 2,0  $\mu\text{m}$  de long et de 0,4  $\mu\text{m}$  à 0,7  $\mu\text{m}$  de large. Un flagelle polaire permet la mobilité des cellules. Les colonies sur milieux PSA (Peptone, Sucrose, Agar) sont rondes, convexes, mucoïdes, brillantes et de couleur jaune pâle (Figure 9 b)) en raison de la production d'un pigment appelé xanthomonadine, caractéristique du genre (Niño-Liu et al. 2006; Bradbury 1984). Les cellules de *X. oryzae* produisent un polysaccharide extracellulaire capsulaire (EPS) important pour la formation de gouttelettes ou exsudats bactériens provenant de feuilles infectées, assurant ainsi une protection contre la dessiccation et facilitant la dispersion par le vent et la pluie (Swings et al. 1990) (Fig. 9). *X. oryzae* est une bactérie aérobie obligatoire et ne forme pas de spores. La température optimale pour sa croissance se situe entre 25 et 30°C. *X. oryzae* est positif pour la catalase, incapable de réduire les nitrates et est un faible producteur d'acides à partir des carbohydrates (Bradbury, 1984). Les deux pathovars peuvent être différenciés par la production d'acétoïne (*Xoo*–, *Xoc* +), la croissance sur la L-alanine comme seule source de carbone (*Xoo*–, *Xoc* +), la croissance sur des casaminoacides sans vitamine à 0,2% (*Xoo*–, *Xoc* +) et la résistance à 0,001% Cu (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (*Xoo* +, *Xoc*–) (Gossele et al. 1985).



Figure 9: Photographie de la morphologie de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. (a) Micrographie électronique à balayage d'une cellule de *X. oryzae* pv. *oryzae* (barre, 1,0  $\mu$ m. Réalisée par K. Tsuchiya). (b) Colonies de *X. oryzae* pv. *oryzae* sur gelose glucosée à l'extrait de levure (Niño-Liu, Ronald, and Bogdanove 2006).

### 2.5.3. Diversité et structure des populations de *Xanthomonas oryzae* :

La littérature abonde d'études de diversité et de structure des populations de *Xanthomonas oryzae*, basées pour la plupart sur des marqueurs moléculaires de type AFLP (Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification), RFLP (Polymorphisme de longueur de fragment de restriction), RAPD (ADN polymorphe amplifié au hasard) et REP-PCR pour PCR palindromique par éléments répétitifs. Elles visent en général à comprendre la structure des populations en mettant en évidence les profils génétiques des souches et en les comparant. En guise d'exemple, aux Philippines, une étude sur la diversité génétique et phénotypique de *Xoo* a permis de mettre en évidence des informations sur la structure génétique de la population bactérienne, son évolution et sa répartition dans le temps ainsi que l'établissement d'une corrélation entre la structure RFLP et les races (Nelson et al. 1994). Les souches de *Xoo* isolées au Népal présentent une diversité pathotypique, génétique et géographique. Sur la base de 171 souches *Xoo* collectées dans huit zones de riziculture à l'échelle du pays, 31 haplotypes moléculaires et cinq lignées génétiques putatives ont été observés (Adhikari et al. 1999). Le même auteur a établi une faible corrélation ( $r = 0,52$ ) entre les haplotypes et les phénotypes de virulence. La diversité génétique de la population Taiwanaise de *Xoo* a été analysée avec trois systèmes de marqueurs génétiques différents, notamment, le RAPD, le RFLP et une méthode de recherche de régions indel des isolats de référence et de signatures de différentes cartes de restriction de génomes (Chien et al. 2019). Il en résulte que cette collection de 51 isolats était constituée de 5 populations clonales, G1, G2a, G2b, G3 et G4. Les analyses SNP et CRISPR spacer suggèrent que G2a et G4 étaient évolutivement plus proches du groupe des isolats de Philippine *Xoo*-A, alors que G3 et G1 étaient plus proches de la souche MAFF311018 originaire du Japon. Les souches de *Xoo* en Asie ont évolué en cinq populations génétiques modernes par analyse RFLP ou VNTR pour répétitions en tandem en nombre variable (Adhikari et al. 1995; Poulin et al. 2015). La population Taiwanaise de *Xoo* avait été caractérisée en cinq groupes génétiques suite à une analyse de REP-PCR sur 88 souches collectées dans 10 grandes centres de production de riz au pays en 1986, 1997, 2000, 2004 et 2011 (Deng et al. 2016). Il a aussi été montré des relations entre les souches Colombienne et Asiatique de *Xoo* (Jones et al. 1989).

Des analyses phylogénétiques basées sur une approche polyphasique combinant RFLP, rep-PCR et AFLP, révèlent qu'il existe trois lignées distinctes au sein de l'espèce *X. oryzae* : les *Xoo* asiatiques, *Xoo* africaines et *Xoc* (d'Asie et d'Afrique). Ces analyses ont été conduites sur des groupes de *Xoo* et *Xoc* d'origines asiatiques et africaines (Gonzales et al 2007). En ajoutant à ces populations bactériennes, les souches *Xoo* d'origines américaines, des analyses de type RLFP suggèrent que les souches américaines de *Xoo* sont génétiquement distinctes de *Xoc* et des populations africaine et asiatique de *Xoo*. (Ryba-White et al. 1995) Cette analyse est confirmée par de nombreuses études de diversité génétique, telque l'arbre phylogénétique obtenu sur la base de neuf gènes conservés sur huit génomes séquencés de *Xoo* (Triplett et al. 2011).

Comparé à *Xoo*, la diversité de *Xoc* est moins étudiée. Cependant, la maladie est considérée comme endémique aux Philippines en raison de la grande diversité des souches (Raymundo et al. 1999). En effet, suite à des analyses RFLP sur une collection de 123 souches de *Xoc*, une importante diversité génétique a été enregistrée tant pour l'ensemble de la collection que pour des sous-ensembles de souches définis dans l'espace et dans le temps. Même un ensemble de souches collectées sur un seul site à la fois était très diversifié. Cette diversité génétique des souches de *Xoc* basée sur la technique de Rep-PCR est également significative dans le sud-ouest de la Chine (Lin et al. 2011). La même équipe de recherche a observé une forte corrélation entre les groupes génétiques et les pathotypes de *Xoc*. De même, en Chine, la première description de la diversité génétique des souches *Xoc* basées sur l'analyse des gènes effecteurs de Type TALE a montré une association hautement significative (Figure 10) entre les 14 génotypes (désignés de 1 à 14) (Figure 11 A) et les pathotypes (I à XIV) (Figure 12 B) définis sur 23 cultivars de riz contenant différents gènes de résistance contre BB (Ji et al. 2014). Dans cette étude, les ADN génomiques des 65 souches originaires de neuf provinces du sud de la Chine, ont été digérés avec BamHI et hybridés avec un fragment interne d'avrXa3. En général, le niveau de virulence des souches serait en relation avec le nombre de gènes TALE putatifs qu'elles disposent (Figure 10). Les souches qui avaient un plus grand nombre de gènes TALE putatifs étaient plus virulentes que les souches qui en avaient moins (Ji et al. 2014).

L'analyse de la diversité d'une population de 338 isolats de l'espèce *X. oryzae* avec l'outil MLVA-16 (Multi locus VNTR Analysis) a permis de confirmer la distinction des deux pathovars *oryzae* et *oryzicola*, des souches asiatiques, des souches africaines et de structurer globalement les réseaux d'haplotypes suivant les pays d'origine (Figure11) (Poulin et al. 2015). Ce même outil a permis de discriminer les isolats de la collection malienne de *Xoo* suivant leurs sites et périodes de collecte (Poulin et al. 2015). Deux autres études de diversité respectivement basées sur l'analyse MLST ( pour Multilocus Sequence Typing) et l'analyse MLSA (pour MultiLocus Sequence Analysis) ont confirmé les trois lignées avec une lignée supplémentaire, celle des *X. oryzae* originaires des USA (L. R. Triplett et al. 2011; Hajri et al. 2012). En 2013, des analyses MLSA et RFLP sur une importante collection de *X. oryzae* ont

révélé l'existence de cinq lignées au sein de l'espèce incluant les souches *Xoo USA* et les souches *X. leersiae* (Figure12)(Wonni et al. 2014).

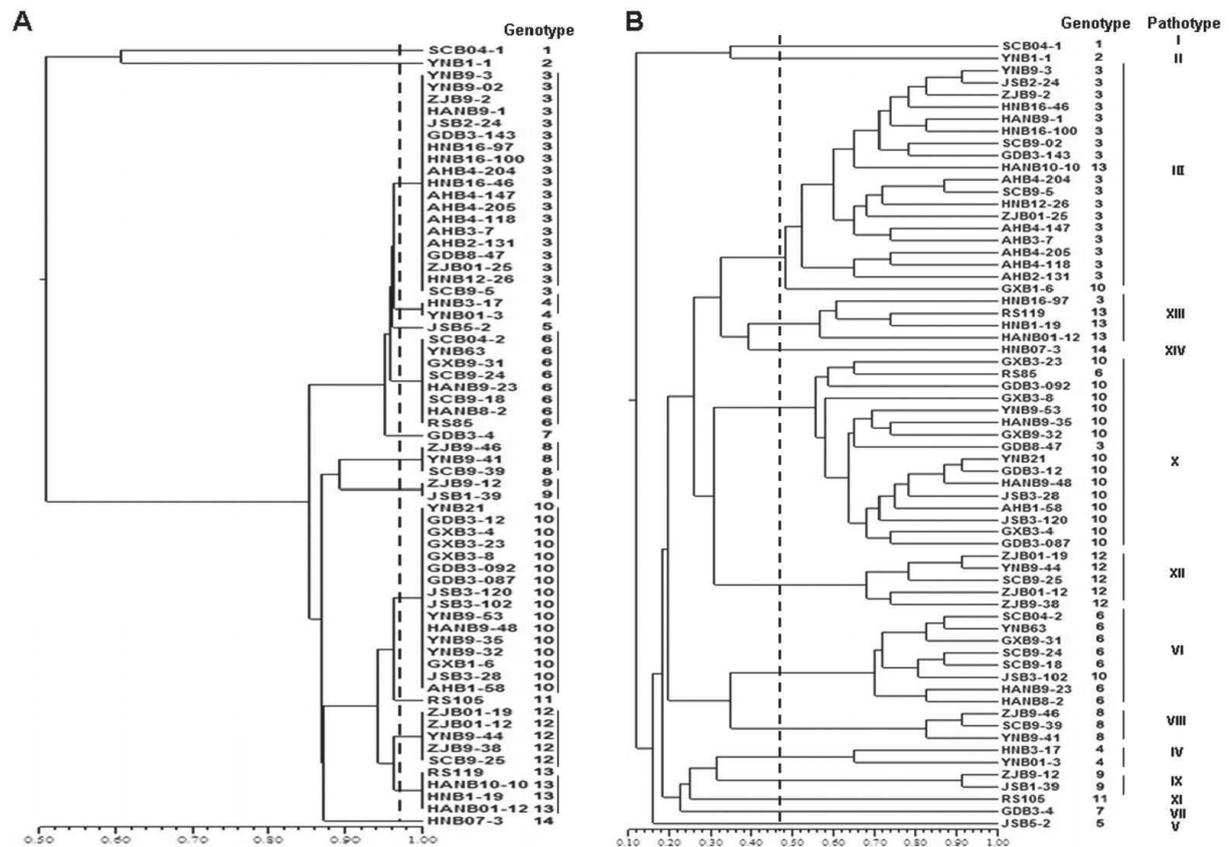


Figure 10: Diversité génétique et pathotypique de 65 souches chinoises de *Xoc* basées sur l'analyse des effecteurs TAL et l'évaluation de la résistance de 23 lignées de riz contenant chacune un gène de résistance contre BB. A, Dendrogramme montrant la parenté des souches basées sur le Southern blot et la présence / l'absence de fragments BamHI (hybridation). Les 14 clusters ont été délimités à un niveau de similarité arbitraire égal à 0,97. B, Dendrogramme sur l'évaluation de la virulence de souches testées. Les pathotypes ont été désignés de I à XIV et regroupés à un niveau de similarité arbitraire égal à 0,5. Source: (Ji et al. 2014).

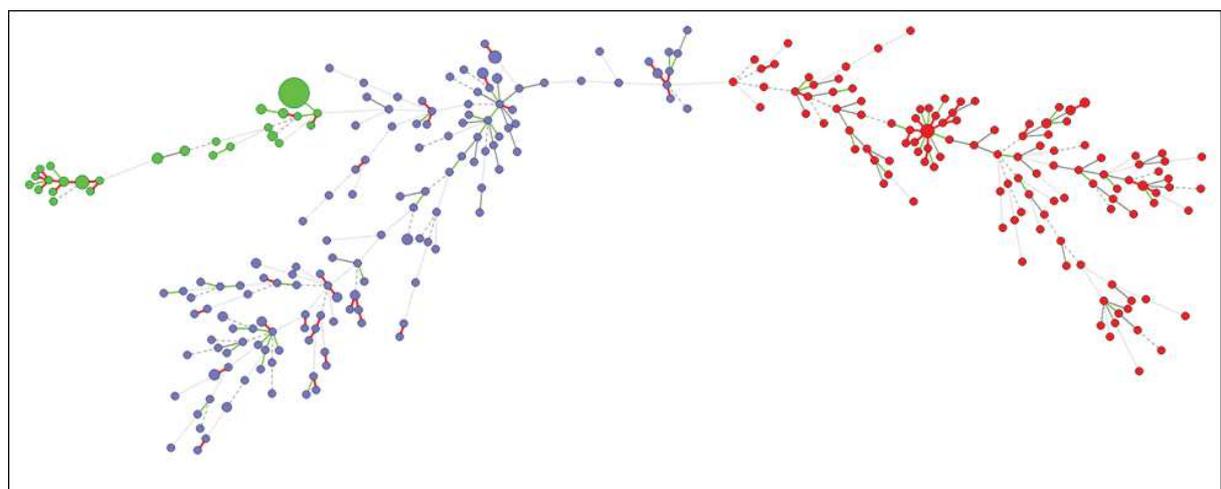


Figure 11: MST ("Minimum spanning tree") d'une collection mondiale de *Xanthomonas oryzae* à l'aide de Bionumerics 7.1 (vert : *Xoo* d'Afrique, bleu : *Xoc* et rouge : *Xoo* d'Asie). Les cercles sont proportionnels au nombre de souches par haplotype. Source: (Poulin et al. 2015).

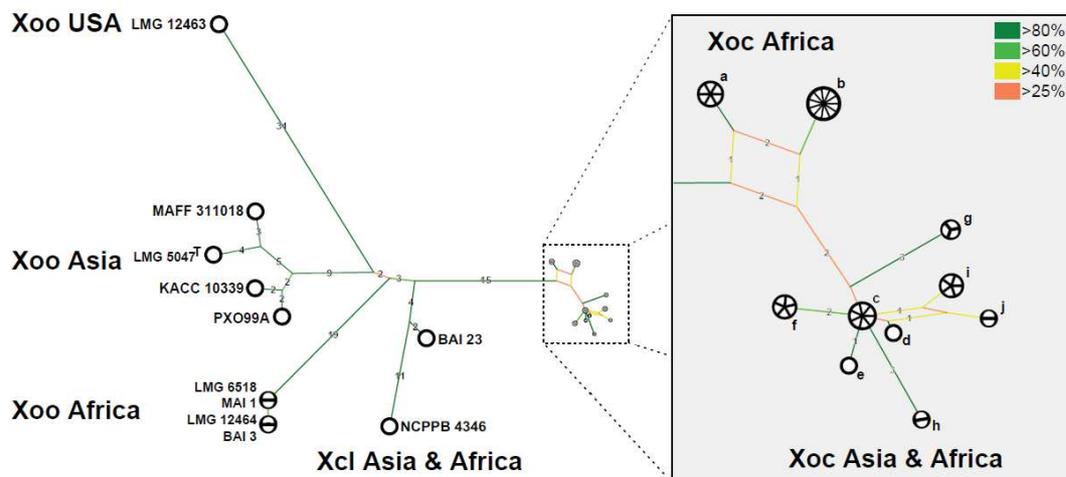


Figure 12: Réseau d'haplotypes (Consensus split network) de *Xanthomonas oryzae* basé sur la MLST de six gènes de ménage concaténés (Wonni et al. 2014).

#### 2.5.4. Génomique comparative des *Xanthomonas oryzae* :

La recherche des déterminants moléculaires de la virulence de *X. oryzae* a connu un essor grâce à l'utilisation de la génomique comparative fonctionnelle et suite au séquençage complet des premiers génomes de *X. oryzae* (Lee et al. 2005; Ochiai et al. 2005). Les quatre premiers génomes complets de *Xoo*, annotés et disponibles pour le public sont asiatiques, notamment, *Xoo*-KACC10331 (Corée) (Lee et al. 2005), *Xoo*-MAFF311018 (Japon) (Ochiai et al. 2005), *Xoo*-PXO99A et un *Xoc*-BLS256 des Philippines (Bogdanove et al. 2011). Plusieurs dizaines de souches de la même espèce ont été séquencées ensuite et pour des besoins de développement de marqueurs moléculaires pour le diagnostic (Lang et al. 2010), d'études de diversité et surtout de recherche des déterminants majeurs de virulence (Doucouré et al. 2018; Quibod et al. 2016). En effet, les séquences génomiques de deux souches américaines de *X. oryzae* ont révélé que les souches américaines forment un nouveau clade au sein de l'espèce *X. oryzae*. En plus des analyses phylogénétiques et comparatives, ces séquences ont été utilisées pour concevoir de robustes amorces spécifiques aux souches américaines, démontrant ainsi l'utilité d'un projet de séquençage du génome dans le développement rapide d'outils de diagnostic (Triplett et al. 2011).

Le génome de *X. oryzae*, estimée à 5 Mb en moyenne, est constitué d'un seul chromosome circulaire, dont le pourcentage en GC varie entre 63,6 % (PXO99A) et 64,05 % (BLS256) (Salzberg et al. 2008; Bogdanove et al. 2011). Ces séquences génomiques présentent un nombre important de réarrangements et un grand nombre d'éléments transposables parmi lesquels des séquences d'insertion (IS) représentées en quatre familles, *IS256*, *IS30*,

*IS630* et *ISL3* (Tang et al. 2006; Salzberg et al. 2008). En effet, les alignements des génomes entiers de *X. campestris pv. raphani* 756C et *X. oryzae pv. oryzicola* BLS256 avec leurs homologues vasculaires respectifs révèlent de nombreux réarrangements et inversions au sein de chaque groupe, mais ceux-ci sont nettement plus fréquents parmi les souches de *X. oryzae* (Fig. 13). Les souches de *X. oryzae* présentent également des insertions et des délétions plus importantes et plus nombreuses. Les séquences d'insertion jouent un rôle dans le transfert horizontal de gènes, les réarrangements, les inversions et les suppressions pouvant conduire à l'acquisition, la modification ou la perte de la fonction d'un gène. En outre, les réarrangements suggèrent que l'activité des éléments IS et la recombinaison des gènes effecteurs TAL contribuent à la structuration en races chez *Xoo* (Ochiai et al. 2005).

Le génome de *Xoc*BLS256 présente quant à lui des caractéristiques générales identiques aux génomes de *Xoo* séquencés avec 245 éléments IS réparties en six familles. Cependant, un cluster de gènes impliqué dans la synthèse et le transport de lipopolysaccharides (LPS) est spécifique au génome de *Xoc*BLS256 (Niño-Liu, Ronald, et Bogdanove 2006).

L'étude de la diversité génomique et fonctionnelle des effecteurs TAL est essentielle pour une meilleure compréhension des interactions riz-*X. oryzae*. Les souches africaines de *Xoo* ne possèdent que 9 TALs (Tran et al. 2018; Doucouré et al. 2018) alors que les séquences complètes de *Xoo* d'Asie, KACC10331, MAFF 311018 et PXO99A indiquent la présence respective de 15, 17, et 19 gènes d'effecteurs TAL. La souche *Xoc* BLS256 en contient 28 (Lee et al. 2005; Bogdanove et al. 2011). Aucun gène d'effeteur TAL n'est présent dans les souches de *X. oryzae* des USA (Triplett et al. 2011; Ryba-White et al. and Leach 1995). Une analyse BLASTN a révélé que les effecteurs de sécrétion de type III prédits et rapportés dans les génomes de *X. oryzae* (Song and Yang 2010; White et al. 2009) étaient presque tous représentés dans les deux séquences américaines de *X. oryzae*, à l'exception de ceux des familles XopU et XopO .

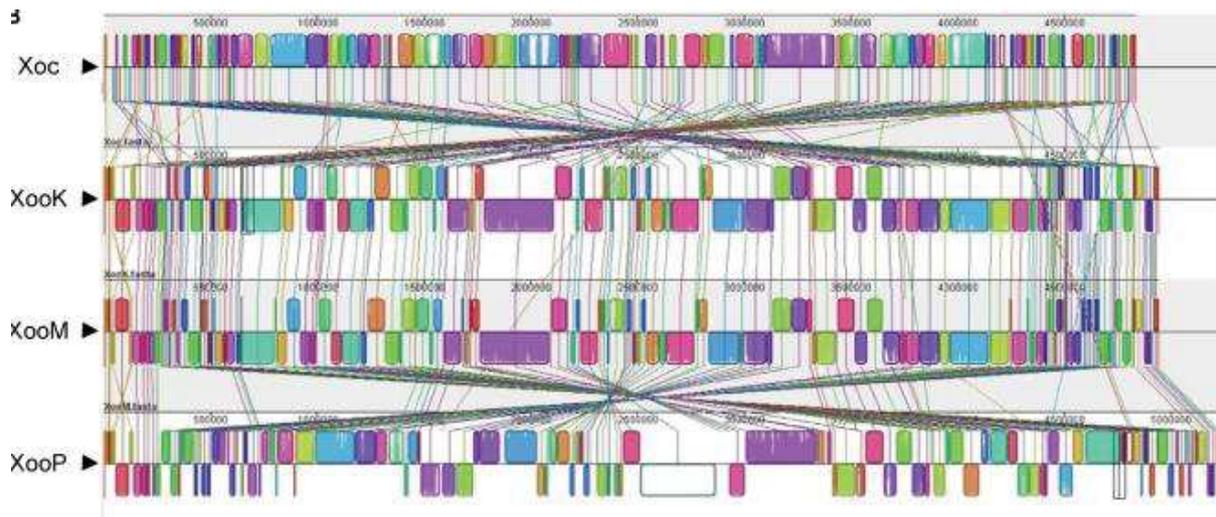


Figure 13: Alignement des génomes complets de *X. oryzae* pv. *oryzicola* BLS256 (Xoc) avec les génomes de *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (XooK), *X. oryzae* pv. *oryzae* MAFF311018 (XooM), et *X. oryzae* pv. *oryzae* PXO99A (XooP). Les blocs représentés sont des blocs colinéaires identiques entre les individus et leur couleur partielle indique un polymorphisme de séquence (Bogdanove et al. 2011).

#### 2.5.5. Diversité pathotypique (phénotype) des *Xanthomonas oryzae* :

La variabilité du pouvoir pathogène de *X. oryzae* pv. *oryzae* est largement décrite (Gonzalez et al. 2007; Quibod et al. 2016; Niño-Liu et al. 2006). Les races constituent un ensemble de souches ayant le même profil de virulence ou d'avirulence sur un ensemble de cultivars différentiels portant différents gènes de résistance. Les lignes IRBB développées à l'IRRI sur un fond génétique IR24 (indica), sont les plus utilisées pour caractériser les races de *Xoo* (Ogawa et al. 1991; tableau 2). Chaque IRBB porte un gène de résistance spécifique (gène *Xa*). Au total, 45 gènes majeurs de résistance ont été caractérisés de nos jours pour le contrôle de *Xoo*. Les races étant dépendante des sources de résistance testées, pour mieux suivre l'évolution du pathogène et faciliter la comparaison entre les races de différents pays et écosystèmes, l'IRRI recommande l'utilisation de 12 gènes de résistance en plus du parent récurrent IR24 (tableau 2) Sur cette base, onze races de *Xoo* ont été identifiées aux Philippines, 14 au Sri Lanka (Ochiai et al. 2000), plus de 60 races en Chine (Liu et al. 2007; Yang et al. 2013), de nombreuses races au Japon, au Népal, en Corée et en Inde et trois en Afrique de l'Ouest (A1, A2 et A3) (tableau 3). La race A3, identifiée au Mali dans les périmètres rizicoles de l'Office du Niger est incompatible sur IR24 et les 12 autres gènes de résistance testés. La race A2 est présente au Burkina Faso, la race A1 au Burkina Faso, au Niger et Cameroun (Gonzalez et al. 2007).

Par ailleurs, de nouvelles races émergent souvent en Asie du fait du contournement des gènes de résistance déployés (Jeung et al. 2006; Vera Cruz et al. 2000). Une simple mutation sur les gènes associés à la virulence peut modifier la race de la souche de *Xoo*, qui n'est pas toujours corrélée à la phylogénie ou au groupe géographique (Ochiai et al. 2005). Il



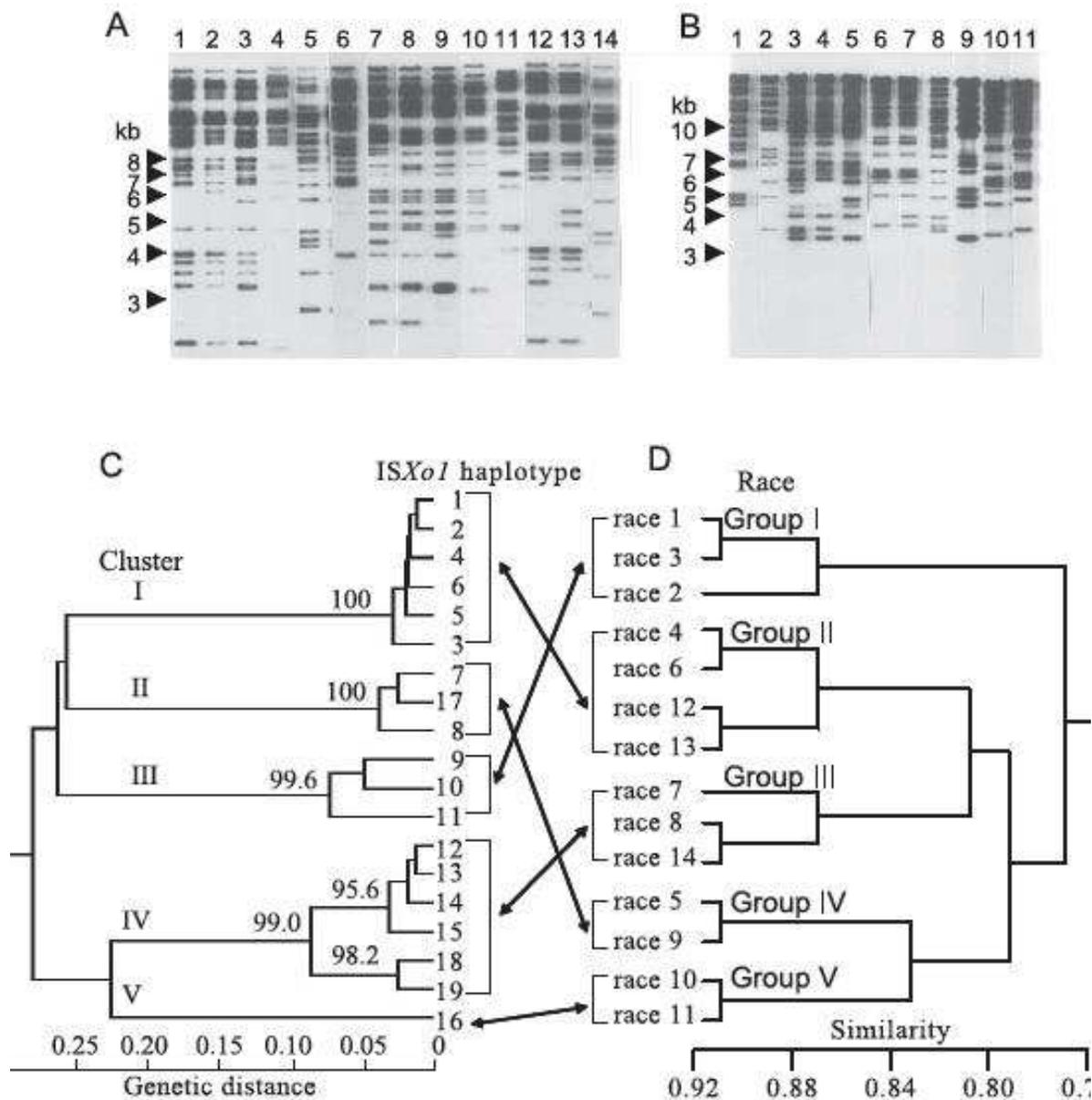


Figure 14: Profils d'hybridation de Southern blot et relations entre les races et les clusters phylogénétiques basés sur l'analyse RFLP des séquences d'insertion *ISXo1*. A: *EcoRI*- & B: *BamHI* ont été utilisés pour digérer l'ADN des souches sri-lankaises de *Xoo* avec *ISXo1* comme sonde. C: Dendrogramme des souches sri-lankaises de *Xoo* basé sur l'approche RFLP et la sonde *ISXo1*. D: Phénogramme des souches sri-lankaises de *Xoo* basé sur la virulence sur 11 lignées quasi-isogéniques et d'un cultivar contenant un seul gène de résistance (*Ochiai et al. 2005*).

### III. Les interactions plantes pathogènes:

Les plantes sont en interaction avec différents pathogènes dans la nature. Elles développent des mécanismes de défense et les pathogènes, des mécanismes de contournement pour causer la maladie. Il s'établit alors une relation de compatibilité ou d'incompatibilité entre le pathogène et son hôte. L'incompatibilité se traduit soit par une

résistance monogénique (verticale ou qualitative), ou par une résistance polygénique (horizontale ou quantitative). Cette réponse de contrôle du pathogène par la plante peut être constitutive et/ou induites, localisée au site d'infection (réponse locale) ou induites dans toute la plante (réponse systémique). Quant à la compatibilité, cette interaction fructueuse avec l'hôte s'établit lorsque le pathogène dispose du potentiel de virulence nécessaire pour coloniser la plante sensible dans un environnement favorable. Les interactions plantes-pathogènes se traduisent ainsi sur le plan moléculaire par une coévolution entre les gènes responsables du système immunitaire ou de défense des plantes et les facteurs impliqués dans la virulence des pathogènes. Cette coévolution moléculaire est décrite (Chisholm et al. 2006; Abramovitch et al. 2006) dans la (figure15) sous le nom de modèle en «zig-zag» (Jones et Dangl 2006).

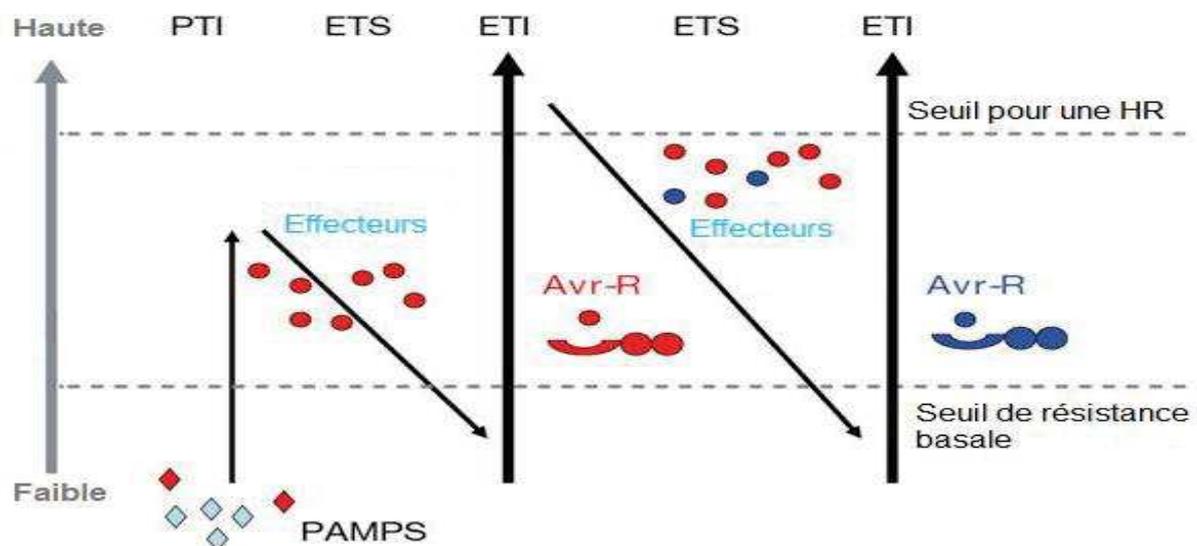


Figure 15: Modèle en Zig-Zag illustrant la coévolution entre les gènes de résistance et les effecteurs impliqués dans la virulence des pathogènes. En 1ère étape, lorsque les cellules végétales reconnaissent les motifs moléculaires de type PAMP associés aux pathogènes à travers les PRR, elles induisent la PTI pour déclencher l'immunité qui lui confère une résistance. En 2ème étape, par le biais de la sélection naturelle, les pathogènes les plus coriaces émettent des effecteurs qui contournent la PTI pour déclencher la maladie, la plante est de nouveau sensible et cette sensibilité est induite par les effecteurs (ETS). En 3ème étape, La plante évolue et se dote d'un gène R qui exprime une protéine NB-LRR qui à son tour reconnaît l'effecteur en voie de translocation en provenance du pathogène et active par la suite l'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI). Cette immunité se traduit par une résistance plus soutenue que l'induction de la mort cellulaire à travers la réaction d'hypersensibilité (HR). En 4ème étape, toujours sur la base de la sélection naturelle, un nouveau cluster de la population bactérienne apparaît avec : 1. perte d'anciens effecteurs reconnus et contrôlés par le système immunitaire des cellules végétales, 2. obtention de nouveaux effecteur capables de contourner l'ETI. Cette acquisition de nouveau gène effecteur se fait en général par conjugaison. Enfin, en étape 5, la sélection variétale privilégie l'utilisation de nouveaux allèles-LRR capables de reconnaître et contrôler les dernières acquisitions bactériennes pour rétablir l'ETI. (Jones et Dangl, 2006).

### 3.1 Défense constitutive :

Les défenses constitutives ou 'passives' sont en général des barrières structurales et biochimiques à la pénétration et au développement de la bactérie au sein de la plante. Les barrières peuvent être physiques comme la cuticule, la cutine, la subérine et de la cire (Chunlin Wang, Chin, and Gianfagna 2000; Mysore and Ryu 2004) ou biochimiques avec la production de composés naturels toxiques et antimicrobiens (ex : flavonoïdes, composés phénoliques, tanins, terpenoïdes...) (González-Lamothe et al. 2009).

### 3.2 Défenses induites :

Les défenses induites sont dépendantes de la reconnaissance des molécules de virulence par les cellules de l'hôte suite à leur translocation par le pathogène. Il existe essentiellement deux systèmes immunitaires chez la plante. La première utilise des récepteurs de reconnaissance de type transmembranaire en réponse à des motifs moléculaires conservés des agents pathogènes en évolution lente, tels que la flagelline (Zipfel and Felix 2005). La seconde agit en grande partie à l'intérieur de la cellule, en utilisant des protéines de résistance polymorphes, codés par des gènes de résistance (*R*), qui reconnaissent des protéines spécifiques de l'agent pathogène et codés par des gènes d'avirulence (*Avr*) (Dangl and Jones 2001). Ces systèmes immunitaires des plantes peuvent être illustrés par le modèle en «zigzag» en quatre phases (figure 15).

#### 3.2.1 L'immunité déclenchée par un PAMP ou PTI (PAMP-Triggered Immunity):

La résistance basale aux maladies est celle activée par des agents pathogènes virulents sur des hôtes sensibles. La reconnaissance de l'agent pathogène est activée par les plantes via la perception de motifs moléculaires ubiquitaires et peu polymorphes appelés éliciteurs généraux. Ces éliciteurs sont constitués de PAMPs (« Pathogen-Associated Molecular Patterns ») ou éliciteurs exogènes et de DAMPs (« Damage-Associated Molecular Patterns »), les éliciteurs endogènes (Zipfel, 2009). Le PAMP par excellence de la PTI est la flagelline bactérienne, qui déclenche les réactions de défense de diverses plantes (Gómez-Gómez and Boller 2002). D'autres éliciteurs exogènes sont reconnus par les plantes, notamment, la chitine (champignons, insectes...) et les lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane, et le facteur d'élongation EF-Tu. (Dodds and Rathjen, 2010; Jones and Dangl, 2006). Quant aux DAMPs, ce sont surtout les produits de dégradation de la paroi végétale libérés par des enzymes de l'agent pathogène lors de l'infection. Parmi ces produits, figurent les oligogalacturonates et des fragments de cuticules (Huckelhoven, 2007; Huffaker et al. 2006). Les PAMPs et les DAMPs sont reconnus par des récepteurs transmembranaires de la cellule végétale, les PRRs (« Plant patternrecognition receptors ») (Zipfel, 2014). Ces récepteurs sont des protéines : (i) de type RK (Receptor Kinase)

avec un domaine kinase intracellulaire et un récepteur extracellulaire de type LRR (Leucine Rich Repeat), (ii) de type RLP (« Receptor Like Proteins ») partageant la même structure que les RKs mais dépourvue de domaine kinase cytoplasmique (Altenbach et Robatzek, 2007). Les protéines RLPs et RKs interagissent le plus souvent pour déclencher la transduction du signal (Zipfel, 2014). Deux systèmes MAMPs/PRRs ont été bien décrits chez *Arabidopsis*, (i) la flagelline flg22 et son récepteur FLS2, (ii) et le facteur d'élongation EF-Tu avec le récepteur EFR. Le couple flg22/ FLS2 a été décrit pour la première fois lors d'une interaction entre *Arabidopsis* et *Pseudomonas syringae* (Felix et al. 1999) et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Sun et al. 2006). La flagelline est reconnue par de nombreuses plantes et les orthologues fonctionnels de FLS2 ont été identifiés chez le riz, la tomate et la vigne (Robatzek et al. 2007; Takai et al. 2008; Trda et al. 2014). La reconnaissance de la flg22 de *Pseudomonas syringae* par le récepteur FLS2 des cellules d'*Arabidopsis* entraîne le recrutement de BAK1, une protéine de type RK-LRR nécessaire à l'activation complète du signal immunitaire (Chinchilla et al. 2007) pour déclencher la mise en place du PTI (PAMP-Triggered Immunity). Le couple EF-Tu / EFR est très étudié chez les bactéries. Le récepteur EFR est une protéine de type RK-LRR chez *Arabidopsis* qui reconnaît de façon directe l'épitope conservé et N-acétylé elf18 correspondant aux 18 premiers acides aminés de EF-Tu (Kunze et al. 2004).

Aussi, de nombreux pathogènes sont capables de contourner ces réponses immunitaires de la plante par l'utilisation des effecteurs qui empêchent le déclenchement de certains facteurs de la défense basale.

### 3.2.2. De la suppression du PTI et ETI (Effector-Triggered Immunity), ETS (Effector Triggered Susceptibility) aux réponses de défenses de l'hôte:

Les pathogènes ont développé plusieurs mécanismes de virulence pour contourner la défense basale des plantes. En effet, pour supprimer la PTI, les pathogènes s'appuient sur des effecteurs de virulence sécrétés dans les cellules hôtes. Il s'ensuit une sensibilité de la plante déclenchée par les effecteurs appelés ETS (pour «Effector Triggered Susceptibility»). Les effecteurs sont des déterminants clés du pouvoir pathogène, permettant aux pathogènes adaptés, (i) la remobilisation des nutriments de l'hôte et (ii) l'inhibition des mécanismes de défense mis en place par la plante suite à la reconnaissance extracellulaire des différents agents pathogènes (Göhre and Robatzek, 2008). Plusieurs auteurs ont mené d'intéressantes études approfondies sur ces effecteurs. En guise d'exemple, OsBAK1 et OsRLCK185 associées à la PTI du riz constituent respectivement des protéines cibles des effecteurs XopAA et XopY de *Xoo*. En présence de OsBAK1, l'effecteur XopAA inhibe la résistance à *Xoo* (Yamaguchi et al. 2013a). De même, l'effecteur XopY interagit avec le récepteur OsRLCK185 pour supprimer les défenses médiées par la chitine et les PGNs (Yamaguchi et al. 2013b). Un seul pathogène peut transloquer jusqu'à plusieurs dizaines d'effecteurs dans les cellules hôtes (Jones and Dangl 2006; Block et al. 2008). Le répertoire des effecteurs est effectivement variable non

seulement en fonction des espèces mais aussi entre les souches de la même espèce (Block et al. 2008).

En réponse à cette spécificité parasitaire des pathogènes, les plantes ont développé un mécanisme de défense inductible robuste et rapide, c'est la résistance spécifique appelée ETI (Effector-Triggered Immunity). Cette immunité des plantes, beaucoup plus efficace que la PTI, est basée sur la reconnaissance d'une protéine dite d'avirulence (Avr) de l'agent pathogène par une protéine végétale dite de résistance (R). Ce mécanisme est formalisé en 1971 par la relation « gène pour gène » (Flor 1971). Les gènes *R* et *Avr* sont généralement polymorphes et ne sont pas présents ou fonctionnels respectivement chez toutes les variétés d'une plante et toutes les souches d'un pathogène (Cette interaction est décrite au chapitre 3.2.2.1).

Pour assurer leur pérennité ou une meilleure colonisation de l'hôte, les pathogènes ont développé d'autres effecteurs pour supprimer l'ETI. C'est le cas de l'effecteur HopF2<sub>Pto</sub> chez *P. syringae* et son récepteur cible correspondant, RIN4 chez *Arabidopsis*. En effet, trois protéines effectrices indépendantes de *P. syringae*, AvrRpm1, AvrRpt2 et AvrB, sont reconnus par la protéine RIN4 d'*Arabidopsis*, entraînant une ETI qui limite efficacement la croissance de l'agent pathogène. L'effecteur de type III, HopF2<sub>Pto</sub>, en ciblant RIN4 compromet sa modification par AvrRpt2 et permet ainsi le contournement de cette résistance par *P. syringae*. HopF2<sub>Pto</sub> a interagi avec RIN4 non seulement en in vitro mais aussi en in vivo. Contrairement à AvrRpm1, AvrRpt2 et AvrB, HopF2<sub>Pto</sub> n'induit donc pas l'ETI mais favorise la croissance de *P. syringae* chez *Arabidopsis*. Cette activité de virulence n'a pas été observée chez les plantes génétiquement dépourvues de RIN4 (Wilton et al. 2010).

D'autres effecteurs sont associés à la manipulation des signaux de défense hormonaux (Kazan and Lyons, 2014; Jelenska et al. 2007; Zheng et al. 2012), à l'induction de gènes de défense (Kim et al. 2008 ; Canonne et al. 2011) et à l'inversion des mécanismes physiologiques établis contre l'entrée du pathogène. En effet, les phytopatogènes tel que *P. syringae* pénètre dans les feuilles de l'hôte à travers les stomates dont la fermeture pour bloquer le passage du pathogène constitue l'une des premières réponses mises en place lors de la PTI. Plusieurs pathovars de *P. syringae* produisent de la coronatine, qui permet la réouverture des stomates (Melotto et al. 2006). Par ailleurs, l'expression transgénique de l'effecteur HopF2 de *P. syringae* inhibe la fermeture des stomates chez *Arabidopsis* et augmente la virulence de souches déficientes en coronatine (Hurley et al. 2014).

#### 3.2.2.1. Les interactions entre les protéines de résistance et les Protéines d'avirulence :

Pour mieux comprendre les interactions entre les protéines R et Avr, trois modèles moléculaires ont été proposés: le modèle ligand-récepteur où l'interaction entre la protéine R et Avr est directe, et les modèles de garde et de « decoy » où l'interaction est indirecte (Figure 16) (Cui et al. 2015; van der Hoorn and Kamoun, 2008).

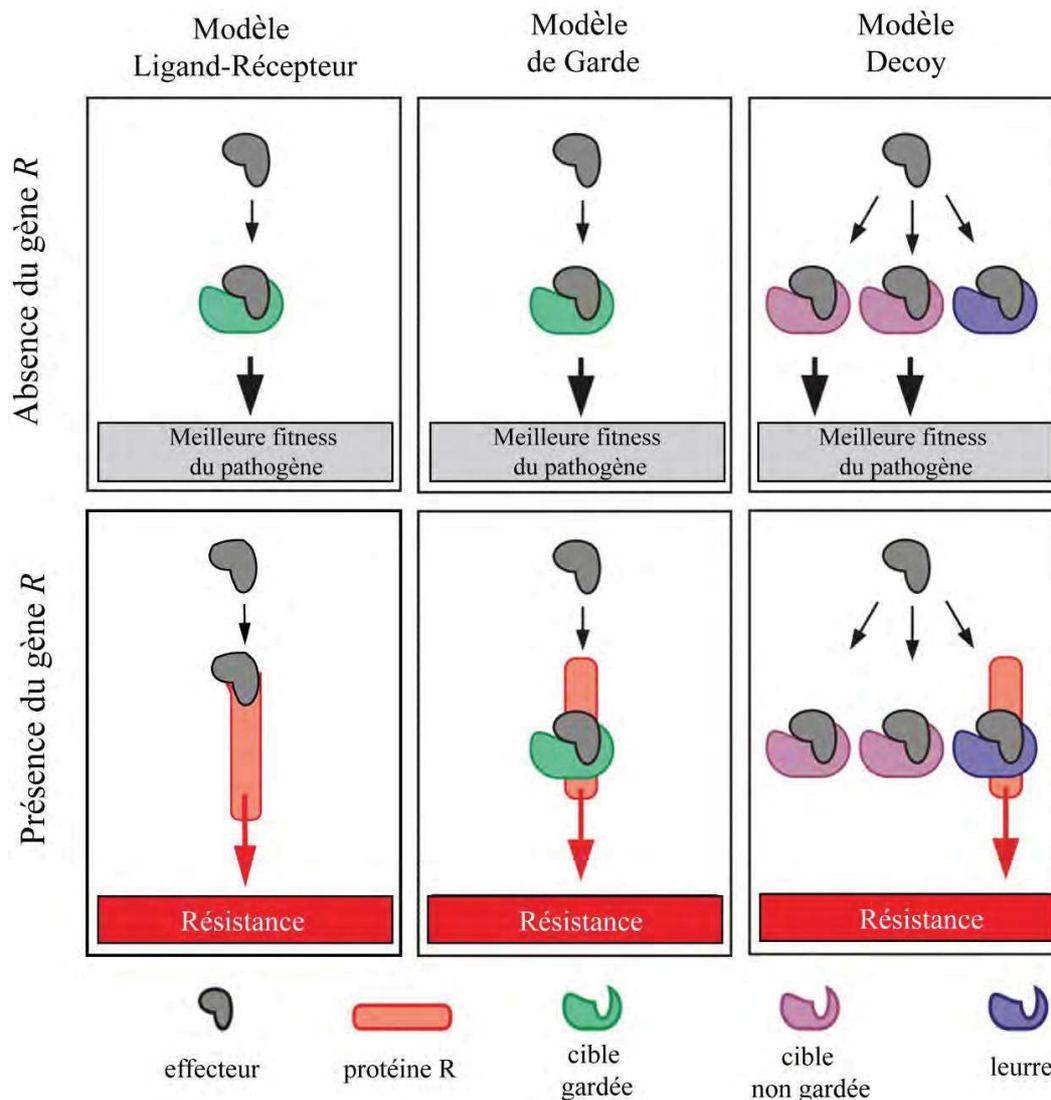


Figure 16: Représentation des trois modèles d'interaction entre protéines de résistance et protéines d'avirulence. Modifié d'après (van der Hoorn and Kamoun, 2008). (i) **Modèle récepteur/ligand**: La liaison entre l'effecteur et sa protéine cible déclenche la maladie. La résistance est activée en présence de la protéine R. (ii) **Modèle de garde**: La maladie est observée suite à la détection de l'effecteur par une protéine de garde. Cependant, la présence de la protéine R renforce la protéine de garde et leur interaction avec l'effecteur induit la résistance. (iii) **Modèle du leurre**: La liaison entre l'effecteur et une cible leurre ou de virulence déclenche la maladie. En présence de la protéine R, la cible leurre se lie à l'effecteur et active la résistance. Source: (van der Hoorn and Kamoun, 2008).

### 3.2.2.1.1. Le modèle ligand-récepteurs:

Suivant ce modèle (Figure 13 i), le gène *avr* serait d'abord responsable de l'expression d'un éliciteur qui interagirait par la suite avec un récepteur spécifique exprimé par le gène R. Le complexe éliciteur/ récepteur induit et transduit le signal de résistance. Bien que ce modèle soit le premier examiné, peu de couples R/Avr se liant de manière directe ont été identifiés (Deslandes et al. 2003; Dodds et al. 2006; Jia et al. 2000; Ueda et al. 2006). La protéine d'avirulence PopP2 (*Ralstonia solanacearum*) est directement reconnue par la protéine R

RRS1-R d'*Arabidopsis*. En effet, il a été démontré que la localisation nucléaire de RRS1-R est dépendante de la présence de PopP2 (Deslandes et al. 2003). La résistance induite par la liaison directe entre l'effecteur d'avirulence Avr-Pita du champignon *Magnaporthe oryzae* et la métalloprotéase Pi-ta du riz a été décrite (Jia et al. 2000). L'effecteur Avr-Pik de *Magnaporthe oryzae* se lie également de manière directe à la protéine de résistance Pik-1 du riz (Kanzaki et al. 2012).

#### 3.2.2.1.2. Le modèle de garde:

La protéine R « garde » un récepteur spécifique, une protéine cible reconnue par le facteur Avr. L'interaction du facteur Avr avec la protéine cible entraîne des modifications dans cette dernière qui induisent l'activation de la protéine R (Figure 14 ii). En général, il en résulte une HR (Dangl and Jones, 2001; van der Hoorn and Kamoun, 2008). En guise d'exemple, les protéines R d'*Arabidopsis* RPM1 (Resistance to *P. syringae* pv *maculicola*1) et RPS2 (Resistance to *P. syringae* 2) « gardent » la protéine RIN4 (RPM1-interacting protein) et cette protéine est la cible de trois effecteurs de *P. syringae*, notamment, AvrRpm1, AvrB et AvrRpt2. (Mackey et al. 2003; Kim et al. 2005). En effet, RIN4 est une protéine membranaire qui est hyperphosphorylée sous l'action des facteurs d'avirulence. Cette modification induit l'activation des protéines de résistance RPM1 et RPS2 (Mackey et al. 2003 ; Chung et al. 2014). Ainsi les gènes codant pour les protéines RPM1 et RPS2 confèrent à *Arabidopsis* la résistance contre certaines souches de *Pseudomonas syringae* sans interagir directement avec l'un des trois effecteurs Avr décrits (Axtell et al. 2001; Kim et al. 2005; Mackey et al. 2003). Aussi, les protéines Avr seraient des facteurs de virulence requis lorsque l'hôte ne possède pas les récepteurs nécessaires à leur reconnaissance spécifique.

#### 3.2.2.1.3. Le modèle decoy:

Dans la nature, la cible effectrice gardée se trouve dans une situation instable puisqu'elle est soumise à deux forces de sélection opposées dans des populations de plantes où les gènes *R* sont polymorphes (Figure 15 iii ; Figure 17). Le polymorphisme du gène *R* suppose la présence ou l'absence de l'allèle *R* fonctionnels chez différents individus dans une population végétale (Figure 17). En absence d'un gène *R* fonctionnel, la sélection naturelle permet à la cible gardée de réduire son affinité de liaison avec l'effecteur, en évitant ainsi la détection et interaction avec l'effecteur (Figure 16). Cependant, en présence d'un gène *R* fonctionnel, une sélection naturelle est attendue pour que les cibles gardées bénéficient d'une meilleure interaction avec un effecteur renforçant la perception du pathogène. Ces deux pressions de sélection concurrentes (Figure 17) sur la même interaction entre l'effecteur et la protéine cible gardée se traduisent par une situation évolutive instable qui pourrait être assouplie lors de l'évolution d'une protéine hôte, appelée ici « leurre ou decoy » (Figure 16 iii), spécialisée dans la perception de l'effecteur par la protéine R mais lui-même n'a aucune fonction dans le développement de la maladie ou de la résistance. Ainsi, le leurre imite les

cibles effectrices pour piéger l'agent pathogène dans un événement de reconnaissance. Les leurres se développent à partir des cibles effectrices par duplication génique suivie d'une évolution indépendante en imitant les cibles effectrices (mimétisme de la cible). Le modèle Decoy suppose que la cible effectrice surveillée par la protéine R est une molécule qui imite la cible effectrice active, mais ne fonctionne que dans la perception d'effecteurs pathogènes sans contribution potentielle à la virulence du pathogène en l'absence de sa protéine R apparentée. (Van der Hoorn and Kamoun 2008). En guise d'exemple, les cibles effectrices, CERK1, EFR1, FLS2 et Pto de la tomate reconnaissent et se lient aux effecteurs AvrPto et AvrPtoB de *P. syringae* (figure 18. 1). Cependant, la protéine kinase Pto «decoy» n'est pas une cible de virulence. La résistance médiée par Pto est dépendante de la protéine de résistance Prf (NB-LRR) (figure 18. 2 « a b c d »). Cette protéine R reste inactive en absence de la reconnaissance de l'effecteur par Pto (Ntoukakis et al. 2014). Ce modèle leurre est différent des modèles de garde classiques qui supposent que la manipulation de la cible effectrice gardée par l'effecteur améliore l'aptitude des pathogènes en l'absence de la protéine R (Figure 16). En plus de la dépendance de la présence simultanée du gène *R* chez la plante et du gène *Avr* chez le pathogène, l'ETI est très souvent associée à une réaction de HR (Hypersensitive response) (Figure 18) qui contrôle efficacement la progression du pathogène.

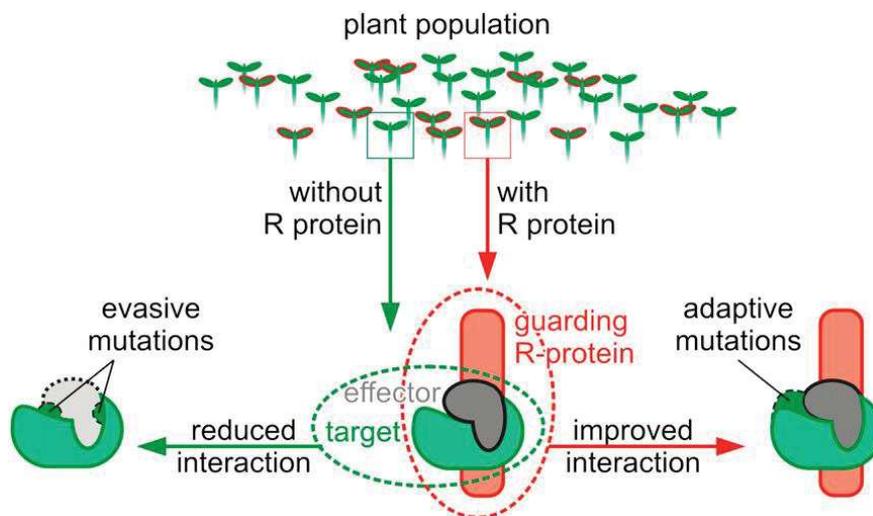


Figure 17: Les forces de Sélection opposées sur des cibles effectrices gardées dans une population végétale polymorphe pour les gènes *R*. Les protéines cibles sont soumises à une pression de sélection pour réduire les interactions et d'éviter les manipulations (à gauche) en l'absence de la protéine *R* (flèches vertes). Cependant, la cible effectrice gardée est également soumise à une pression de sélection mais tout d'abord pour améliorer l'interaction avec l'effecteur et par la suite parfaire la perception de l'agent pathogène (droite) en présence de la protéine *R* (flèches rouges). Une duplication génique de la cible effectrice ou l'évolution indépendante d'un mimique cible réduirait les contraintes évolutives imposées à la cible effectrice gardée, lui permettant de se spécialiser en tant que corécepteur (leurre) régulant l'activation de la protéine *R* (van der Hoorn and Kamoun 2008).

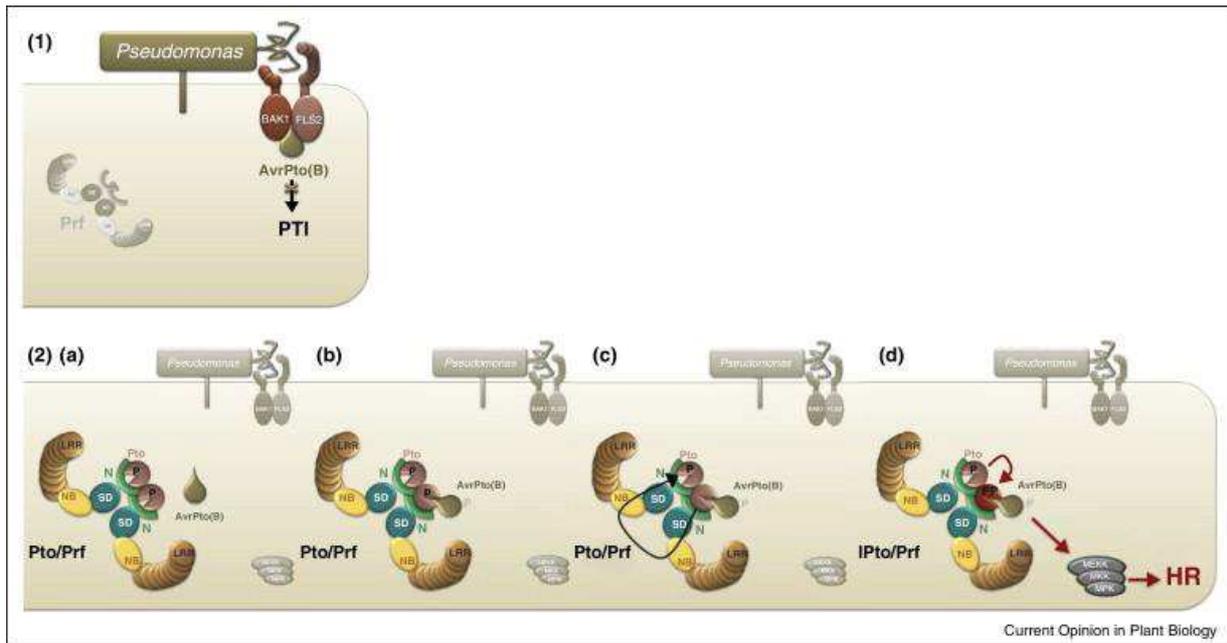


Figure 18: De l'infection de lignées de tomate sensibles par *Pseudomonas syringae* à l'activation du complexe immunitaire Pto / Prf dans les lignées résistantes. 1. Les plants de tomates sensibles portent des Prf et des kinases de type Pto (Pto-like kinases), mais manquent de Pto. Les effecteurs AvrPto et AvrPtoB suppriment les premières défenses en inhibant les domaines kinase intracellulaire de BAK1 et FLS2 (et d'autres PRR). La plante est alors sensible aux infections bactériennes. 2. (a) Le complexe Pto / Prf est composé d'au moins deux molécules Pto et de deux molécules Prf, et le domaine N-terminal de Prf est le site primaire de l'interaction. (b) Lors de la reconnaissance de l'un des effecteurs par une molécule de Pto (capteur), sa boucle P + 1 est perturbée et la Pto subit un changement de conformation. (c) Ceci est détecté par le domaine Prf N-term et par conséquent, Prf libère sa régulation négative sur Pto qui est associé à un site NB fonctionnel. (d) La deuxième molécule Pto-helper du complexe Prf transphosphorylate le premier capteur-kinase, conduisant à l'activation du complexe, entraînant finalement la réponse hypersensible (Ntoukakis et al. 2014).

### 3.2.2.2. La Réaction d'Hypersensibilité :

La réaction d'hypersensibilité (HR) se traduit par la mort des cellules végétales localisées au site d'infection quelques heures après l'infection (Klement and Goodman 1967). Elle se caractérise par une nécrose de confinement de l'agent pathogène. La HR est donc une résistance locale très efficace basée sur un principe de mort cellulaire programmée au cours de laquelle, les plantes induisent un « burst » oxydatif avec production de formes réactives d'oxygène (ROS) et de monoxyde d'azote (NO) (Delledonne et al. 2001; Zurbriggen et al. 2010). Les ROS les plus exprimées par la plante en dose toxique pour les cellules végétales et les pathogènes sont les super oxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Nanda et al. 2010). Ces substances sont également impliquées dans l'expression des gènes de résistance et dans le renforcement des parois cellulaires. Ce sont aussi des messagers (acide salicylique) associés à la modification de flux d'ion K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup> (Macarasin et al. 2010; Xia et al. 2012). La réponse d'hypersensibilité induit également la production des protéinases impliquées dans

la dégradation des parois bactériennes, la défensive (Boman 2003; Thomma et al. 2002; Carvalho and Gomes 2009; Martin et al. 2003). La HR est ainsi une résistance locale et systémique de la plante en réponse à une attaque pathogénique.

## IV. Mécanisme moléculaire des interactions riz-*Xanthomonas oryzae* :

### 4.1 Déterminisme moléculaire de la pathogénicité chez *Xanthomonas oryzae* :

#### 4.1.1. Le système de sécrétion de type III (SST3) :

Les interactions de la plupart des bactéries à Gram négatif avec leurs hôtes dépendent des systèmes de sécrétion de type III (SST3) ou système HRP (« Hypersensitivity Response and Pathogenicity ») schématisé par une seringue moléculaire (Figure 19). Les analyses de la génomique comparée ont révélé que les *Xanthomonas* hébergent différents types connus de systèmes de sécrétion de protéines (du type I au type VI) (Büttner and Bonas 2010). Cependant, le SST3 est essentiel à la pathogénicité de la plupart de ces bactéries (Ryan et al. 2011) en assurant la translocation des protéines effectrices (effecteurs de type 3, ET3) dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il couvre les deux membranes bactériennes et est prolongé par un conduit creux, le pilus, qui traverse la paroi cellulaire de la plante (Weber et al. 2005). Le SST3 est codé par les gènes *hrp* hautement conservés, appelés *hrc*, pour induire soit la HR sur des plantes hôtes, non hôtes / résistantes, soit la pathogénie sur des hôtes sensibles (Alfano and Collmer 1997; Bogdanove et al. 1996; Lahaye and Bonas 2001). Une mutation de ces gènes peut rendre la bactérie porteuse non pathogène. Les SST3 sont également responsables de la translocation des protéines d'avirulence et des harpines dans les cellules hôtes (James et al. 2004; Choi et al. 2013). Le groupe de gènes *hrp* comprend six opérons (*hrpA* à *hrpF*) chez les *xanthomonas*. Ces gènes sont régulés positivement par HrpG et HrpX (Wengelnik and Bonas 1996), et sont réprimés dans des milieux riches en éléments nutritifs, mais induits dans des milieux limités en éléments nutritifs et à l'intérieur de l'hôte (Tsuge et al. 2002). HrpG, membre de la famille de régulateurs de réponse à deux composants OmpR, régule l'expression de *hrpX*, codant pour un activateur transcriptionnel de type *AraC*, qui active ensuite l'expression d'autres opérons de *hrp*. Un cluster de gènes *hrp* a été identifié chez *Xoo* avec 26 gènes, y compris *hpa2* et *hrpF*. Suivant le degré de conservation des gènes *hrp*, on distingue deux groupes de clusters *hrp*. Le groupe I est constitué des clusters *hrp* de *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii* et *Pseudomonas syringae*. L'expression des gènes *hrp* de ce groupe (Figure 17 A) est dépendante de HrpL, un facteur sigma de type ECF capable de reconnaître la séquence conservée ou «*hrp box*» (GGAACC-N15-CCACTAT) (Tsuge et al. 2006). Le contrôle de l'expression de ces gènes implique les régulateurs intracellulaires HrpS et HrpR chez *P. syringae*; HrpX et HrpY chez *Erwinia* et *Pantoea* (Jin et al. 2003; Merighi et al. 2003). Quant au groupe II, il est constitué des clusters *hrp* de *Xanthomonas sp* et *Ralstonia solanacearum* (Cornelis, 2006). L'expression des gènes *hrp* des bactéries de ce groupe est activée par un

régulateur transcriptionnel de la famille AraC concomitamment avec les effecteurs de type III (Figure 18 B). Le régulateur HrpX se fixe au motif PIP «Plant Inducible Promoter» pour contrôler directement l'expression des gènes du SST3 chez *Xanthomonas* spp. (Koebnik et al. 2006). Par contre, chez *R. solanacearum*, le régulateur HrpB reconnaît la boîte *hrpII* et contrôle l'expression des gènes du TSS3 (Cunnac et al. 2004). Dans les deux cas, l'expression des régulateurs est activée par HrpG, un régulateur transcriptionnel de la famille OmpR (Wengelnik et al. 1999).

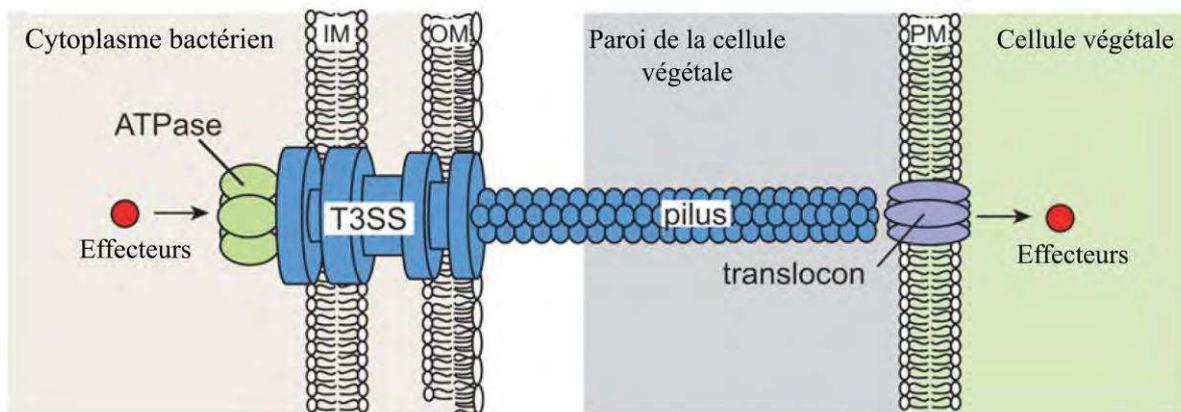


Figure 19: Schéma du système de sécrétion de type III (SST3) chez les bactéries phytopathogènes (en fonction). La base ou appareil de sécrétion couvrant les deux membranes bactériennes, est doté d'une ATPase cytoplasmique. Son prolongement, le pilus, encore appelé aiguille, émerge de la bactérie, avant de traverser la paroi de la cellule hôte et permettre finalement la translocation des effecteurs dans le cytosol à travers le pore formé par les translocateurs. En effet, les translocateurs sont sécrétés et assemblés au sommet de l'aiguille pour former un pore de translocation dans la membrane cytoplasmique de la cellule végétale. IM : Membrane interne ; OM : Membrane externe, PM : Membrane plasmique végétale. Schéma proposé par (Büttner and He 2009).

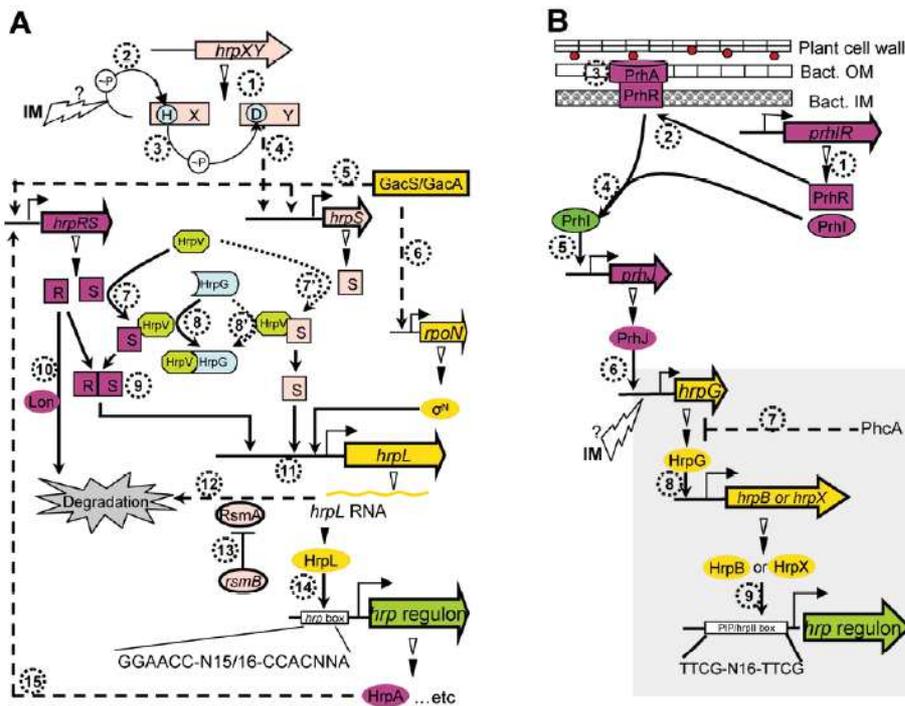


Figure 20: Modèles de régulation des gènes du système Hrp chez les bactéries phytopathogènes. Les chiffres indiquent les principaux événements de signalisation. A, Les bactéries du groupe I. 1. L'opéron *hrpXY* chez *Erwinia* spp. et *Pantoea stewartii* est transcrit et traduit en protéines HrpX et HrpY. 2, Le signal intermédiaire (IM: Signal inconnu induit) déclenche l'autophosphorylation de HrpX. 3, HrpX phosphoryle HrpY. 4, HrpY active la transcription de *hrpS* par un mécanisme inconnu. 5, GacS / GacA active la transcription de *hrpS* chez *Erwinia* spp. et *Pantoea stewartii* et *hrpRS* chez *Pseudomonas syringae*. 6, GacS / GacA active la transcription de *rpoN* chez *Erwinia* spp, *Pantoea stewartii* et *P. syringae*. 7 et 7', HrpS est réprimé par HrpV à travers une interaction protéine-protéine. 8 et 8', HrpG interagit avec HrpV et déréprime HrpS. 9, les protéines HrpS et HrpR forment un hétérodimère chez *P. syringae*. 10, la protéine HrpR est dégradée par la protéase Lon chez *P. syringae*. 11, HrpR et HrpS chez *P. syringae* et HrpS chez *Erwinia* spp. et *Pantoea stewartii* s'associent à RpoN dans le promoteur *hrpL* pour activer l'expression de *hrpL*. 12, l'ARN *hrpL* est dégradé par un mécanisme dépendant de RsmA. 13, l'ARN *rsmB* inhibe la fonction de RsmA. 14, HrpL reconnaît le promoteur de la boîte *hrp* et active la transcription des régulons *hrp*. 15, HrpA agit en amont de la transcription de *hrpRS* pour stimuler l'expression du gène du T3S. B, Les bactéries du groupe II. 1. Les protéines PrhI et PrhR sont codées par l'opéron *prhIR*. 2, la protéine PrhR est localisée dans la membrane interne des bactéries. 3, la protéine PrhA localisée dans la membrane externe perçoit le signal de la paroi cellulaire de la plante et le transfère à PrhR. 4, PrhR active PrhI. 5, PrhI active la transcription de *prhJ*. 6, PrhJ active la transcription *hrpG*. 7, PhcA réprime *hrpG* au niveau post-transcriptionnel. 8, HrpG active la transcription de *hrpX* chez *Xanthomonas* spp. et *hrpB* chez *Ralstonia solanacearum*. 9, HrpX et HrpB activent les promoteurs de la boîte PIP / *hrpII*. Les composants de la zone en grisé sont nécessaires à l'activation des gènes *hrp* chez *Xanthomonas* spp et *Ralstonia solanacearum*. Les composants de la zone claire sont des gènes de *R. solanacearum* spécifiquement requis pour l'activation des gènes *hrp* chez les plantes. Source : (Tang, Xiao, and Zhou 2006)

#### 4.1.2. La famille d'effecteurs de type TALs (transcription-activator like) :

Les bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas* injectent des protéines de type TALE (transcription-activator like effector) dans les cellules de la plante hôtes. Parmi ces effecteurs certains jouent un rôle majeur dans l'interaction (Boch and Bonas 2010; Bogdanove et al. 2010; Schornack et al. 2013). Dans le noyau de la cellule des plantes sensibles, certains TALEs activent la transcription de gènes cibles appelés gènes de sensibilité (S) dont les expressions permettent le développement de la maladie (Yang and White 2004; Bogdanove et al. 2010). Cependant, dans un contexte incompatible, certains TALEs induisent l'expression de gènes de résistance (R) dit exécuteurs (E) permettant de bloquer le développement de la maladie. Les TALEs sont ainsi codés par une famille multigénique et constituent des protéines dont la structure est extrêmement conservée (90 à 97% d'homologie de séquence) (Kay and Bonas 2009; Schornack et al. 2006; White et al. 2009; White et al. 2000). Le premier TAL est l'effecteur AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Bonas et al. 1989). Il a été rapporté que ces effecteurs de type 3 sont constitués de 39 groupes suivant les structures et la similarité de leurs séquences (White et al. 2009). Le répertoire TAL varie de zéro à 28 (Tableau 4) chez les pathogènes du genre *Xanthomonas* (Scholze and Boch 2011). Le grand nombre de gènes effecteurs TAL chez ces espèces pourrait refléter «l'investissement» évolutif des souches dans l'utilisation des effecteurs TAL pour la virulence (Vikal and Bhatia 2017). La diversité des effecteurs TAL observée chez les pathovars, *Xoo* et *Xoc*, serait un réservoir de gènes permettant le développement de nouveaux allèles de virulence pour le ciblage de nouveaux gènes de sensibilité (Yang and White 2004).

Tableau 4: Nombre d'effecteurs TAL chez les bactéries phytopathogènes.

	hôte	Nombre d'effecteurs TAL
<i>Xanthomonas</i> spp.		
<i>X. campestris</i> pv. <i>musacearum</i>	Bananier	0
<i>X. campestris</i> pv. <i>vasculorum</i>	Canne à sucre	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Poivron et tomate	0-2
<i>X. gardneri</i>	Poivron et tomate	0-1
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Brassicaceae	0-5
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	Soja	1
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	Manioc	2 à 6
<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	Brassicaceae	0 à 3
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>	Agrumes	2 à 4
<i>X. fuscans</i> ssp. <i>aurantifolii</i>	Agrumes	2 à 4
<i>X. translucens</i> pvs.	Céréales	0 à 6
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	Coton	6 à 10
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Riz	9 à 16
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Riz	12 à 28
<i>Ralstonia</i> spp.		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Large gamme d'hôtes	0-1

Source: (Scholze and Boch, 2011)

#### 4.1.2.1. Structure et fonction des effecteurs TAL:

Les effecteurs TAL sont des protéines sécrétées par les bactéries pathogènes dans les cellules végétales, où elles pénètrent dans le noyau et activent l'expression de gènes cibles. En effet, pour induire la maladie chez le riz, *Xoo* emprunte un T3SS (Figure 19) pour sécréter les protéines effectrices (Figure 21 a) avant de les transloquer efficacement dans le cytoplasme des cellules végétales via un complexe translocon bactérien «semblable à une aiguille» qui s'insère dans la membrane plasmique de la plante (Büttner and Bonas 2002) (Figure 19). Une fois transloquées, les effecteurs TAL passent dans le noyau via le système d'import nucléaire de la cellule eucaryote, où ils se lient à une séquence d'ADN (dite EBE pour « Effector binding element » ou UPT pour « UP-regulated by TAL ») dans le promoteur de gènes cibles dont ils induisent spécifiquement l'expression. Les effecteurs TAL modulent ainsi les réponses immunitaires des plantes en facilitant les processus nutritionnels ou de virulence au profit de l'agent pathogène. Ces effecteurs TAL ont une architecture modulaire qui comprend une région N-terminale, une région centrale constituée de plusieurs répétitions en tandem de 33/34 acides aminés (aa) et une région C-terminale (Figure 21 a). L'extrémité N-terminale des protéines effectrices de *Xanthomonas* porte les signaux de sécrétion et de translocation (Büttner et al. 2004) (Figure 21 a).

La région C-terminale porte deux à trois motifs NLS «Nuclear Localization Signal» fonctionnels, en plus du domaine d'activation de la transcription (AAD pour "Acidic Activation Domain") (Figure 21 a). Les NLS sont essentiels au transport de l'effecteur TAL vers le noyau de la cellule végétale grâce à leur liaison à la sous-unité  $\alpha$  de l'importine (Szurek et al. 2001). L'AAD assure le recrutement de la machinerie de transcription.

Quant à la région centrale, elle permet la liaison avec l'ADN cible (Doyle et al. 2013; Schornack et al. 2013). Elle est constituée de 1,5 à 33,5 répétitions avec une moyenne de 17,5, (Figure 21 b). La dernière, coté C-terminal, nommée « demi-répétition », est tronquée et réduite à seulement 20 acides aminés. L'analyse des séquences de 113 effecteurs TAL (Figure 21 c) a révélé que la majorité des répétitions est composée de 34 acides aminés (34 aa). Par contre, les répétitions de 33 aa sont moins fréquentes avec une délétion à la position 13 (Boch and Bonas, 2010). Il existe également des répétitions de 30 aa à 42 aa (figure 21 c). Le nombre et la disposition de ces répétitions déterminent la spécificité de reconnaissance de la séquence nucléotidique ciblée (Schornack et al. 2013; Boch and Bonas 2010). Les répétitions de 33 à 34 aa sont quasi-identiques à l'exception de ceux en position 12 et 13. En effet, les aa en position 12 et 13 de chaque répétition sont appelés RVD pour «Repeat Variable Di-residues» (Figure 21 c) (Jens Boch and Bonas 2010). L'enchaînement des RVD consécutifs (Figure 22 a) détermine la nature et la longueur de la séquence nucléotidique ciblée (EBE) (Moscou and Bogdanove 2009). L'interaction avec le promoteur cible est donc dépendante de la séquence des RVDs. Sept RVD uniques sur vingt-cinq répertoriés chez *Xanthomonas* sont fortement représentés (HD, NG, HG, NN, NS, NI et N\*) (Figure 21 b) (Bogdanove et al. 2010) et au moins six répétitions seraient indispensables pour induire un gène cible

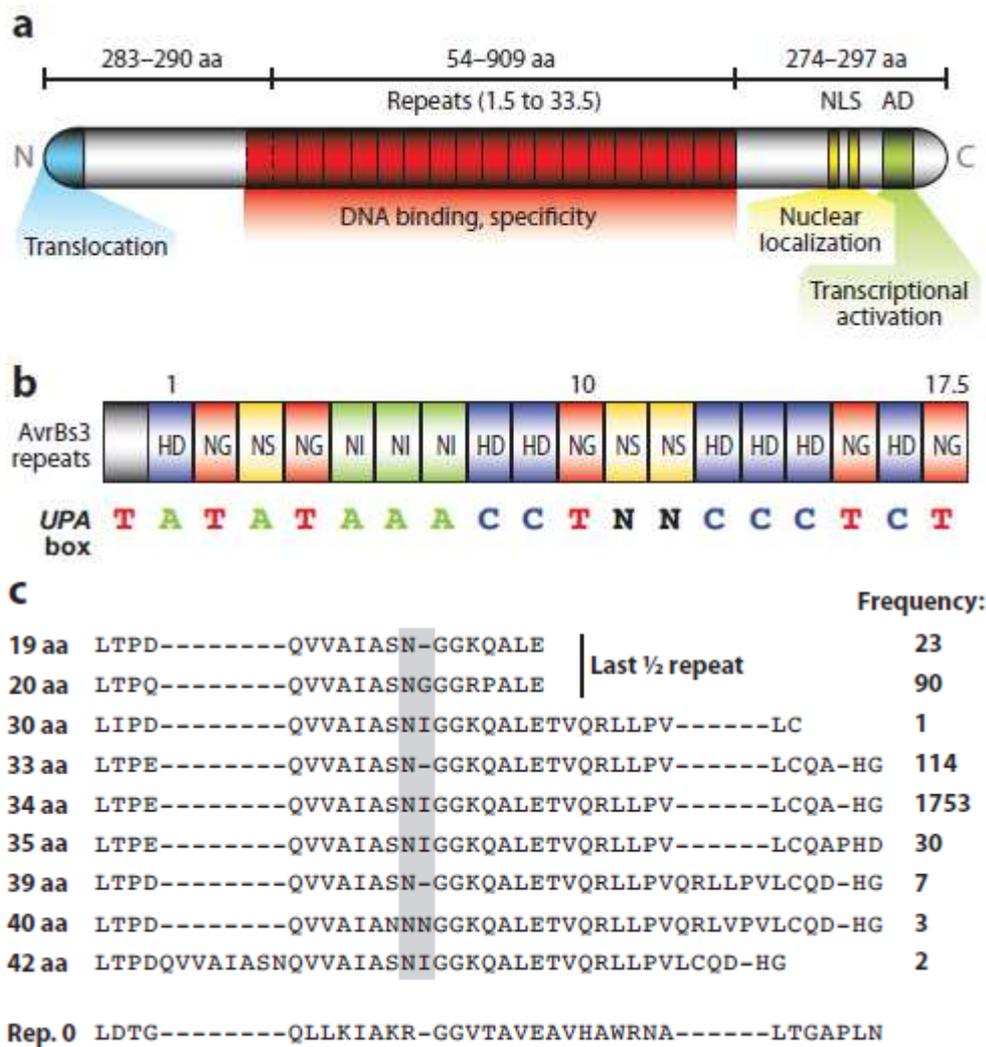


Figure 21: Schéma de la structure des effecteurs TAL de *Xanthomonas*. (a): Représentation schématique des trois domaines fonctionnels d'un TALE. La région N-terminale porte le signal de localisation nucléaire. Le domaine central impliqué dans la fixation à l'ADN est constitué de répétitions en tandem dont le nombre peut varier de 1,5 à 33,5 avec une moyenne de 17,5. La répétition «zéro» indiquée en pointillés correspond à une séquence différente, mais contribue à la liaison de la protéine TAL à l'ADN cible. La région C-terminale possède le signal de localisation nucléaire NLS: "Nuclear Localization Signal" et le domaine d'activation de la transcription AD: "Activation Domain" impliqués dans l'activation. (b): Classification des 17,5 répétitions d'AvrBs3 de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* en fonction des RVDs ou les acides aminés en position 12 et 13 de chaque répétition. Les couleurs affichées sont spécifiques aux types de répétition. La boîte de consensus UPA (pour "Upregulated by AvrBs3") correspondante est indiquée sous les répétitions. (c): Séquences en acide aminés des répétitions de différentes tailles. Les chiffres à gauche et à droite illustrent respectivement la taille des répétitions et la fréquence d'apparition de ces répétitions dans le domaine central des effecteurs TAL. Les résidus grisés correspondent aux RVDs (Jens Boch and Bonas 2010).

(Boch and Bonas 2010). Chaque RVD reconnaît de manière spécifique un nucléotide de la boîte cible (Figure 22 a), décrit par le «code TAL». En guise d'exemple, les RVDs NI, HD, NG et NN ont respectivement une spécificité pour A, C, T et G ou A (Figure 22 a). Ainsi, HD reconnaît une cytosine alors que NG ou HG reconnaissent une thymine (Figure 22 c). Les RVD ont également

des degrés de spécificités d'interaction variables, ainsi le RVD NN peut se lier à une guanine (G) ou une adénine (A) alors que le RVD NG est spécifique de la thymine (T). Le code a été découvert en 2009 simultanément par deux équipes, via une approche génétique et computationnelle (Boch et al. 2009; Moscou and Bogdanove, 2009). Il est ainsi possible de prédire par voie bio-informatique les cibles potentielles d'un effecteur TAL pour le peu qu'on dispose de sa séquence en RVDs et du promoteur de l'hôte.

#### 4.1.2.2. Structure du domaine de liaison des effecteurs TAL à l'ADN :

La cristallographie du TAL *PthXo1* de *Xoo* en liaison avec son ADN cible a été résolue (Gao Haishan, Wu Xiaojing, Chai Jijie, 2012; Mak et al. 2012). Cette structure cristallographique a permis de mieux appréhender le rôle des différentes composantes du complexe TALE-ADN cible (Figure 22 b c) (Mak et al. 2012). Les répétitions en tandem du domaine centrale des effecteurs TAL sont constituées de répétitions canoniques et non canoniques (de Lange et al. 2014).

- ✓ Les répétitions canoniques sont quasi identiques et portent les RVDs. Leur structure tridimensionnelle révèle que ces répétitions canoniques forment ensemble, une super hélice qui s'enroule autour du double brin d'ADN cible (Figure 22 b). La découverte et une compréhension détaillée de cette structure ont permis de confirmer la responsabilité du résidu en position 13 dans la spécificité de liaison à l'ADN alors que le 12 assure la stabilisation. Les résidus aux positions 14, 16 et 17 contribuent également à l'interaction avec le squelette de l'ADN et la demi-répétition située dans la région C-terminale contribue à la reconnaissance non spécifique et à la stabilisation du complexe TALE-ADN (Wan et al. 2013). En plus, de nouvelles analyses ont révélé que la substitution d'une cystéine en position 30 par la serine ou l'alanine réduit l'activité des interactions TALE-ADN (Schreiber et al. 2015). Ce résidu cystéine de chaque répétition est donc très important dans l'activité des TALEs (Wan et al. 2013).
- ✓ Les répétitions canoniques sont flanquées en N- et C-terminal par des répétitions non canoniques, respectivement au nombre de 4 et 2 (de Lange et al. 2014). Ces répétitions non canoniques sont très divergentes les unes des autres mais possèdent aussi bien que les répétitions canoniques une structure en épingle à cheveux similaire (Gao et al. 2012). Chaque répétition possède deux hélices  $\alpha$  et une boucle intermédiaire. Aucune structure cristallographique contenant les répétitions non canoniques n'a été encore réalisée. Les répétitions +1 et +2 en C-terminal ont été considérées comme non canoniques uniquement sur la base des prédictions réalisées sur les séquences. La contribution des répétitions non canoniques en N-terminal (0, -1, -2 et -3) à l'affinité et à la spécificité de liaison à l'ADN a été structurellement confirmée. (Schreiber and Bonas, 2014; Gao et al. 2012). L'analyse du code TALE a révélé que la plupart des nucléotides cibles possède une thymine correspondant à la répétition 0 nommé T0 dans la région N-terminale (Boch et al. 2009; Moscou and Bogdanove, 2009). En substituant la thymine (T0) par A, G ou C dans

l'EBE ciblée par l'effecteur TAL Hax3, il a été prouvé que le nucléotide T0 contribue à l'activité de l'effecteur Hax3 chez *N. benthamiana*. Le nucléotide T0 serait donc essentiel pour l'activité d'un effecteur TAL (Boch et al. 2009). Cependant, tous les nucléotides ciblés ne possèdent pas la thymine à la position 0. En effet, comme une exception, l'EBE ciblé par TalC (chez *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*) a plutôt une cytosine en position 0, et le premier RVD est un NS au lieu de HD (Yu et al. 2011).

#### 4.1.2.3. TAL artificiel, TALEN :

L'architecture modulaire des effecteurs TAL a facilité leur développement et leur application en tant qu'outils artificiels de ciblage génique, notamment sous la forme de nucléases spécifiques à un site (Mak et al. 2013). En utilisant des TALE conçus sur mesure pour étudier la fonctionnalité des gènes cibles de l'hôte impliqués dans l'interaction *Xoo* / riz, il a été démontré que *xa13* pouvait être induit par *Xoo* et conférer la sensibilité, indiquant ainsi une preuve supplémentaire que *Os8N3* (*OsSWEET11* ou *Xa13*) est un gène S. Cette approche a facilité l'identification d'*OsSWEET12*, un autre gène S. Il a été rapporté que l'allèle *xa27* peut être activé en déclenchant une résistance aux bactéries exprimant un dTALE correspondant (Chen et al. 2010; Li et al. 2013).

L'activation par des dTALE de ces 3 gènes (*xa27*, *xa13* et *OsSWEET12*) a entraîné des modifications phénotypiques de la résistance ou de la sensibilité à la maladie en réponse à l'infection par *Xoo*, démontrant l'utilité des dTALE pour l'analyse fonctionnelle d'un gène.

**a**

aa 12	aa 13	Fréquence	Spécificité observée	Spécificité prédite	X. oryzae pv. oryzae (1119)	X. oryzae pv. oryzae (475)	Autres pv. de Xanthomonas (429)
N	H	391	A		X	X	X
	G	334	T		X	X	X
	N	312	GA		X	X	X
	S	163	ACGT		X	X	X
	I	138		CT	X	X	X
	D	12		C	X	X	
	K	6			X	X	
	V	3			X	X	X
	A	2			X		
	H	1			X		
H	D	527	C		X	X	X
	G	106		T	X	X	
	A	6		C	X	X	
	I	4			X		
	H	4			X	X	
	N	2			X	X	
S	I	2			X		
	N	1			X	X	
	S	1			X		
I	G	2	T				X
	C	1				X	

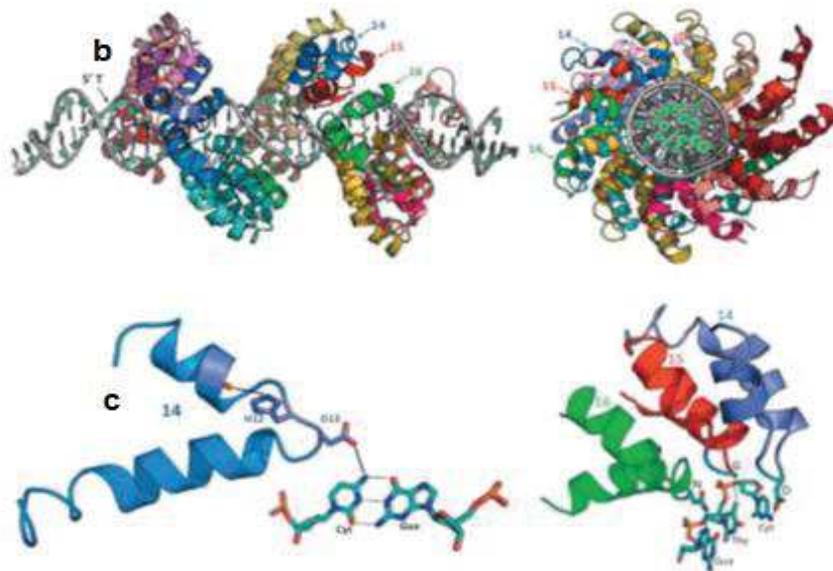


Figure 22: Base de la spécificité et structure de l'association effecteur TAL-ADN cible. (a) : Matrice d'association RVD-nucléotide. De gauche à droite les acides aminés en position 12 et 13 de chaque répétition (RVDs), leur fréquence, leur spécificité observée et leur spécificité prédite évaluées à partir de 113 TALEs. Le tiret indique l'absence de l'acide aminé en position 13 (Boch and Bonas, 2010). (b) Illustration du domaine central de l'effecteur Tal PthXo1 lié à son ADN cible correspondant. (c) Illustration de l'interaction entre le RVD 'HD' (résidus 12 et 13) de la répétition 14 et la cytosine correspondante de la molécule d'ADN cible (Doyle et al. 2013; J Boch and Bonas 2010).

#### 4.1.3. Effet des TALEs dans la sensibilité du riz aux *Xanthomonas oryzae* :

La sensibilité aux maladies infectieuses causées par des agents pathogènes affecte la plupart des plantes dans leur habitat naturel et entraîne des pertes de production relativement importantes en agriculture. Les effecteurs TAL constituent un facteur essentiel à la mise en place de cette sensibilité chez l'hôte nécessitant souvent le contournement de la résistance (PTI et ETI). Le pathovar *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* possède 12 à 28 effecteurs TAL, alors que les souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* n'en contiennent que 9 à 16 parmi lesquels neuf (9) clonés de différentes souches sont connus comme effecteurs de virulence majeurs chez Xoo. (Scholze and Boch 2011). Ces gènes sont *pthXo1*, *pthXo2*, *pthXo3*, *pthXo6*, *pthXo7*, *avrXa7*, *TalC*, *TalF* et *TalB* (Tran et al. 2018). L'effecteur *PthXo1* est un effecteur de virulence majeur de la souche PXO99A. Il induit l'expression du gène hôte *Os8N3/Sweet11*, membre de la famille des SWEET, et code pour un transporteur d'efflux de sucrose (Yang et al. 2006). Deux autres effecteurs TAL de PXO99A contribuent également à la virulence (Sugio et al. 2007). *PthXo6* et *PthXo7* augmentent respectivement la transcription des gènes hôtes *OsTFX1* et *OsTFIIAγ1*. Le *Tal PthXo8* a été également identifié chez PXO99A avec des effets quantitatifs similaires à ceux de *pthXo6*. Il a été prouvé par expériences que les souches mutées dans les gènes codant un de ces effecteurs TAL majeurs de virulence perdent significativement leur pouvoir pathogène (Yang and White, 2004). En plus de l'importance des effecteurs TAL dans la virulence des *Xanthomonas oryzae*, certains gènes cibles de plantes sont essentiels aux développements de la maladie. En effet, ils permettent et favorisent la liaison avec la protéine effectrice des pathogènes (Lapin and Van den Ackerveken, 2013). Les gènes cibles dont l'expression est associée au développement de la maladie sont appelés « gène de sensibilité S » et leur induction est capitale pour la colonisation bactérienne de l'hôte. L'identification des gènes S chez différents hôtes de *Xanthomonas* a été largement facilitée par la mise en évidence du code TALs ou code de liaison des effecteurs TAL à l'ADN. En général, les gènes de sensibilité codent pour des transporteurs ou des facteurs de transcription fortement associée au développement de l'hôte.

##### 4.1.3.1. Les transporteurs membranaires:

Les transporteurs de sucre sont essentiels au maintien des niveaux de glucose dans le sang animal, à la production de nectar de plantes et au développement des graines et du pollen (Chen et al. 2010).

##### 4.1.3.1.1. SWEET:

Initialement appelée Nodulines de type 3, et décrits pour la première fois dans les nodules de *Medicago truncatula* (Guan et al. 2008), certains membres de la famille des gènes SWEET qui codent pour des transporteurs de sucres constituent les principales cibles des effecteurs TAL dans les interactions riz-*Xanthomonas oryzae* (Yang et al. 2006; Antony et al.

2010). Ces gènes cibles sont dit gènes de sensibilité en raison de leur implication dans la mise en place de la maladie (Chen 2014). Il en résulte de l'expression de ces gènes, des protéines membranaires associées à diverses fonctions de la plante, notamment, le développement du pollen (Guan et al. 2008), la senescence (Quirino et al. 1999) et les interactions plantes pathogènes (Streubel et al. 2013). Une insertion d'ADN-T dans *OsSWEET14* a entraîné un retard de croissance et la petitesse des graines des plants de riz homozygote (Antony et al. 2010). Il a été également rapporté qu'*OsSWEET11* est associé à la fertilité des plantes, en effet, les plantes qui en sont éteintes sont moins fertiles (Yang et al. 2006). Le génome du riz comporte 22 paralogues. Dans la nature, pour réussir une interaction fructueuse, les effecteurs TAL de *Xoo* ciblent au moins trois gènes SWEET du riz, notamment: TAL *PthXo1* de la souche de *Xoo PXO99A* induit le gène *OsSWEET11 (Xa13/Os8N3)*, TAL *PthXo2* des souches de *Xoo JXO1A* et *MAFF311018* induit *OsSWEET13 (Xa25)*, les TALs *AvrXa7* de *Xoo PXO86*, *PthXo3* de *PXO61*, TalC de *BAI3* et Tal5 de *MAI1* induisent le gène *OsSWEET14* (Antony et al. 2010; Chu et al. 2006; Streubel et al. 2013; Yang 2004; Yu et al. 2011; Zhou et al. 2015). La famille SWEET est multigénique et divisée en 4 clades au minimum chez les plantes (Figure 23) (Chen et al. 2010). Les 3 gènes SWEETs ciblés par les effecteurs TAL de *Xoo* sont tous membres du clade III. A la suite de tests d'induction de chacun des 22 gènes SWEET du riz avec des TAL artificiels, il a été établi que les 5 membres du clade III agissaient comme des gènes de sensibilité majeurs (Li et al. 2013; Streubel et al. 2013) (Figure 23). En général, ils codent pour des transporteurs de sucre qui entraînent l'efflux de sucrose des cellules du parenchyme du phloème vers l'espace intercellulaire où il serait disponible pour la bactérie (Chen et al. 2012) (Figure 24). Les gènes SWEETs sont alors essentiels aux phytopathogènes vasculaires de type *Xoo* pour coloniser le riz. Tel n'est pas le cas pour les isolats de *Xoc* qui sont des pathogènes non vasculaires n'ayant pas de cible apparentée pour provoquer le BLS chez le riz. Une souche de *Xoc* a été dotée d'un TAL *Xoo* pouvant induire un gène SWEET. Cet essai avec apport d'effeteur TAL n'a pas permis à la souche bactérienne de coloniser les vaisseaux du xylème (Verdier et al. 2012).

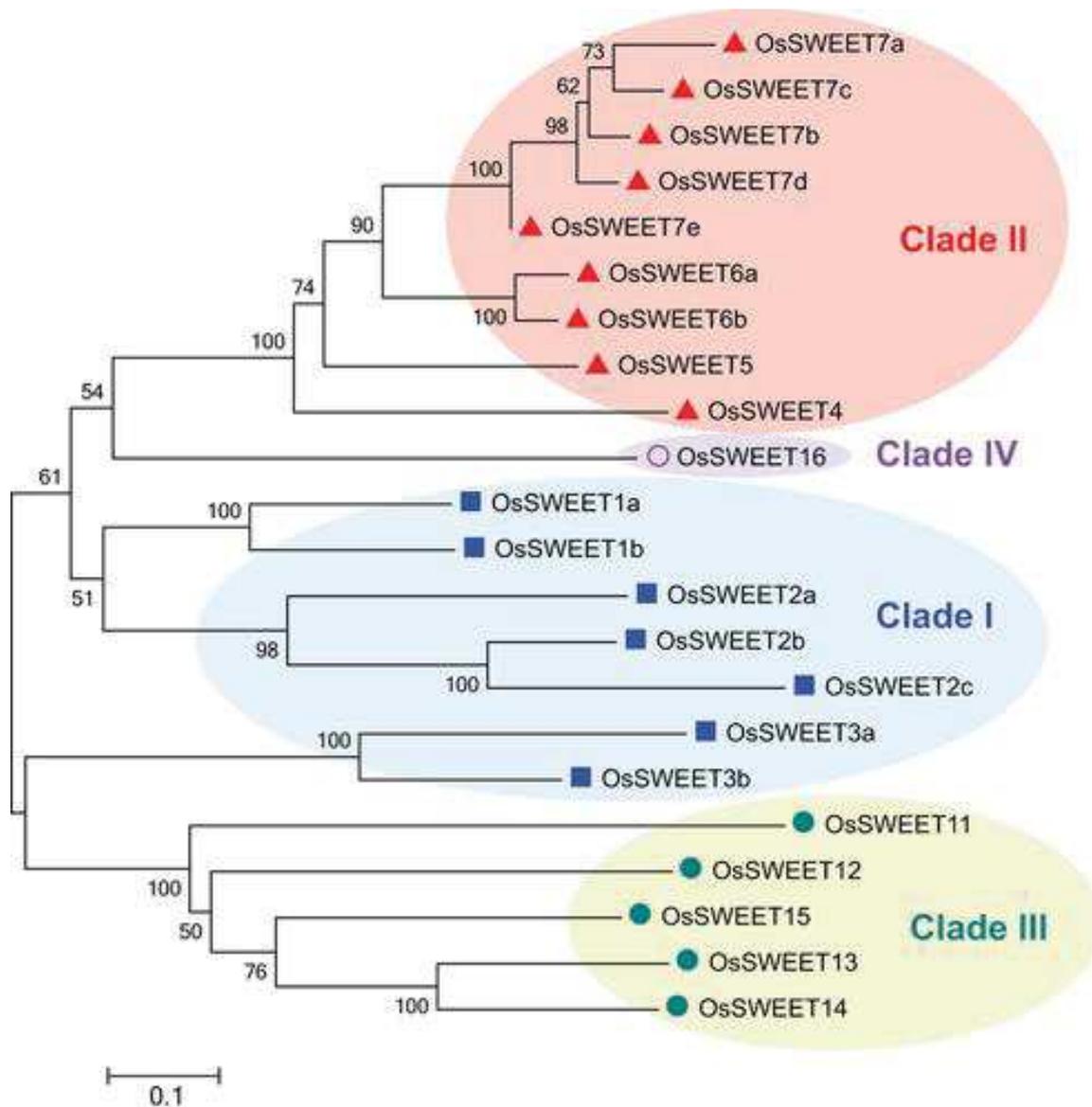


Figure 23: Arbre phylogénétique des protéines OsSWEET. Les séquences en acides aminés ont été obtenues auprès d'UniProt et alignées à l'aide de MUSCLE avec les paramètres par défaut. Les alignements ont été analysés par la méthode neighbor-joining à l'aide de MEGA5.10. Les chiffres aux nœuds représentent les valeurs de pourcentage de bootstrap basées sur 1 000 répliquats. Protéines du clade I sont signalées par des carrés bleus; clade II par des triangles rouges; clade III par des points verts; Clade IV, cercle violet (Streubel et al. 2013).

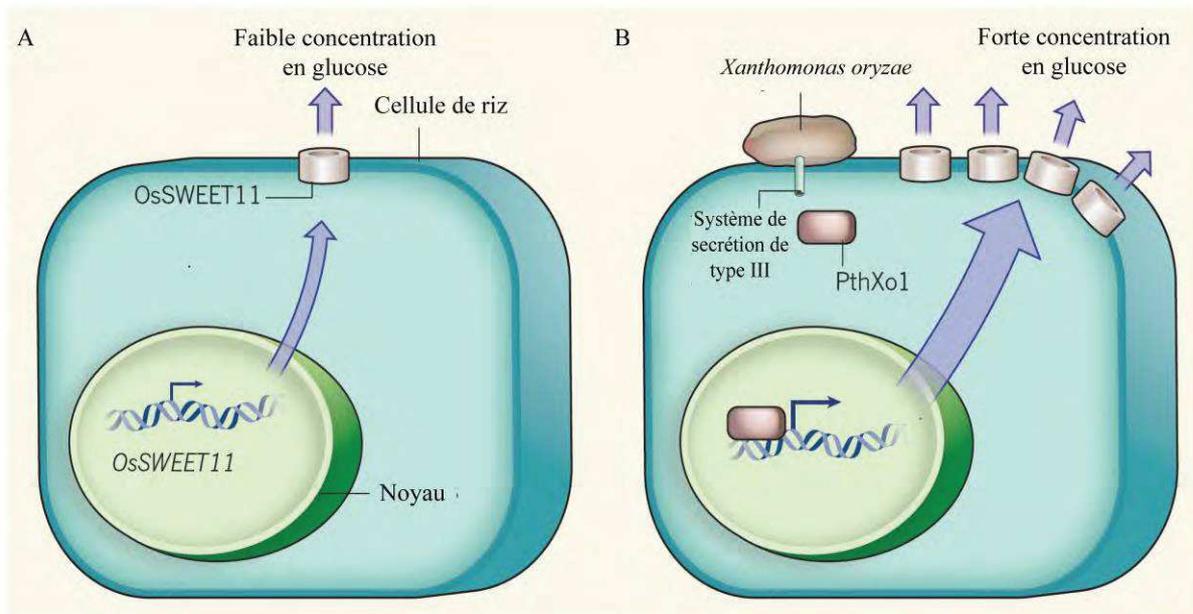


Figure 24: Induction de gènes SWEET par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. A. Expression de gènes *OsSWEET* y compris *OsSWEET11* dans une cellule de riz en état d'équilibre, non infectée, entraînant de faible niveau d'efflux de glucose. B. Surexpression d'*OsSWEET11* aboutissant à une surproduction de glucose suite à l'induction du gène S par l'effecteur TAL *PthXo1* transloqué dans la cellule végétale via le système de sécrétion de type 3 du pathogène. Le glucose est orienté vers les espaces intercellulaires où les microorganismes se développent. Source: (Talbot 2010).

#### 4.1.3.1.2. Le transporteur de sulfate *OsSULTR3;6* :

Un gène de sensibilité significativement associé à la mise en place de la bacteriose à stries foliaires (BLS) a été identifié chez le riz. En effet, *OsSULTR3;6* a été découvert à la suite d'une combinaison d'analyses basées sur la mutagenèse systématique des gènes TAL de *Xoc* BLS256 et la validation fonctionnelle des gènes cibles correspondant. Ce gène cible code pour un transporteur de sulfate et son induction par l'effecteur *Tal2g* soutient l'exsudation et le développement des lésions (Cernadas et al. 2014).

#### 4.1.3.2. Les facteurs de transcription :

Les effecteurs TAL *PthXo6* et *PthXo7* de la souche de *Xoo* PXO99 ont pour cibles respectifs chez le riz, *OsTFX1*, un facteur de transcription de la famille des *bZIP* (basic-domain leucin-ZIPper) et *OsTFIIAγ1α*, un facteur de transcription général, (Sugio et al. 2007). Le gène *OsTFX1* est induit non seulement par des souches Asiatiques de *Xoo* (White and Yang, 2009) mais aussi par des souches Africaines (Tran et al. 2018). La perte de *pthXo6* a entraîné une réduction de la virulence de l'agent pathogène et la sur-expression d'*OsTFX1* dans les lignées transgéniques a rendu ces plants hautement sensibles à une souche de PXO99 portant une mutation dans le TAL *pthXo6*. Cette expérience valide *OsTFX1* comme étant un gène S (Sugio et al. 2007).

#### 4.1.3.3. Gènes cibles dont la fonction de sensibilité doit être validée :

Les effecteurs TAL, PthXo8 de *Xoo* et Tal1c de *Xoc* induisent une cible commune, le gène OsHen1 codant pour une méthyltransférase (Moscou and Bogdanove, 2009). Le choix des deux pathovars à induire un même gène cible suggère l'importance de son rôle dans le pathosystème riz-*Xanthomonas*. En effet, OsHEN1 est connu pour son rôle physiologique de choix dans la stabilisation des petits ARNs. (Cernadas et al. 2014).

#### 4.1.3.4. Convergence de cibles:

Chez le riz, la famille des gènes SWEETs est une cible majeure des effecteurs TAL de *Xo*. De cette famille SWEETs, les 5 membres du clade III sont potentiellement des gènes de sensibilité, parmi lesquels, SWEET14 apparaît comme étant très intéressante de par le fait qu'elle est la cible de 4 effecteurs TAL avec différentes séquences RVD. Ces effecteurs TAL sont secrétés par des souches génétiquement et géographiquement éloignées. Cette même famille SWEETs est ciblée par au moins trois autres espèces de *Xanthomonas*. Ces données valident la convergence inter-espèce et intra-pathovars. La convergence des effecteurs TAL pour une cible serait un bon indicateur dans les programmes d'identification de nouveaux gènes S. En outre, les prédictions computationnelles suggèrent que la convergence fonctionnelle ne serait pas une exception chez les effecteurs de type TALs (Perez-Quintero et al. 2013).

#### 4.1.4. Les gènes d'avirulence chez *X. oryzae pv. oryzae*:

Les effecteurs de type Tal AvrBs3 / PthA sont fortement impliqués dans la virulence de *X. oryzae pv. oryzae*. Il a été proposé que deux gènes *raxP* et *raxQ* de *Xoo* sont requis pour l'activation d'*AvrXa21*. Il a également été observé que le domaine d'activation de la transcription et les séquences NLS dans *AvrXa7* sont nécessaires pour l'activité de virulence, ce qui suggère que les produits du gène *avr* agissent comme des facteurs de virulence qui pénètrent dans le noyau de l'hôte et affectent directement la transcription du gène de l'hôte (B. Yang et al. 2000). L'adaptation d'une race bactérienne avirulente à des variétés hôtes contenant un seul gène R dominant résulte souvent de la perte de fonction du gène *avr* correspondant. Cependant, la pénalité liée à la forme physique associée à la perte du gène *avr* peut prévenir les épidémies (Shen et al. 2002). En général, les races *Xoo* sécrètent chacune des effecteurs spécifiques à la race dans le xylème pour déclencher une réponse spécifique ou provoquer une infection (Hummel et al. 2012). Les facteurs qui activent les gènes de résistance à *Xoo* sont connus sous le nom de facteurs d'avirulence. Certains TALEs ont une activité d'avirulence. La plupart de ces gènes ne présentent aucune similarité avec d'autres gènes de fonction connue (Bonas et Lahaye, 2002) et très peu de domaines conservés ont été répertoriés à ce jour (Rouxel et Balesdent, 2010). Le pathovar *X. oryzae pv. oryzae* possède trois effecteurs TAL clonés avec une activité d'avirulence, *avrXa7*, *avrXa10* et *avrXa27* (Gu et al. 2005; Hopkins et al. 1992). Ces gènes sont impliqués dans l'induction d'une réaction de

type HR: c'est le cas de *Xa27* activé par *avrXa27* présent chez certaines souches de *Xoo* (Gu et al. 2005).

#### 4.2. Mécanisme moléculaire de la résistance du riz au flétrissement bactérien :

Tableau 5: Les gènes de résistance BB caractérisés au niveau moléculaire.

S. No.	Gene	Encoded protein	Reference
1	<i>Xa1</i>	NBS-LRR	(Satomi Yoshimura et al. 1998a)
2	<i>Xa3/Xa26</i>	Leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK)	(Xinli Sun et al. 2004)
3	<i>xa5</i>	TFIIA Transcription factor	(Iyer and McCouch 2004; Jiang et al. 2006)
4	<i>Xa10</i>	Executor R protein, encodes 126 AA, with four potential transmembrane helices	(Tian et al. 2014)
5	<i>xa13</i>	MtN3/saliva	(Chu, Fu, et al. 2006)
6	<i>xa21</i>	Receptor-like kinase	(W.-Y. Song et al. 1995)
7	<i>Xa23</i>	Executor R protein, encodes 113 AA, with four potential transmembrane helices	(Chunlian Wang et al. 2015)
8	<i>xa25</i>	MtN3/saliva	(Q. Liu et al. 2011)
9	<i>Xa27</i>	Apoplast (rice unique gene)	(Keyu Gu et al. 2005a)[13]

Source: (Vikal and Bhatia 2017)

Les gènes de résistance identifiés à ce jour pour le contrôle des souches de *X. oryzae pv. oryzae* sont au nombre de 44, ce qui comparé aux 80 gènes de résistance contre la pyriculariose du riz est moindre. Cette différence pourrait être associée à la nature atypique des gènes de résistance au flétrissement bactérien (tableau 5). En effet, sur la base du fait que neuf gènes *Xa* clonés et caractérisés codent pour différents types de protéines (tableau 5), les mécanismes moléculaires de la résistance au flétrissement bactérien du riz semblent être très différents de ceux de la pyriculariose. La plupart des gènes de résistance au BB clonés ne codent pas pour la famille de protéine R la plus commune, NBS-LRR, pour nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein en Anglais (Liu et al. 2010). Seul *Xa1* sur les 9 clonés est un NB-LRR et un tiers des gènes identifiés sont récessifs (Zhang and Wang 2013) (tableau 5). Les gènes *Xa21* et *Xa26* codent pour des protéines de type récepteur, les produits de l'expression des autres gènes sont uniques et sont absents dans d'autres espèces végétales (Dai et al. 2007). Les neuf gènes de résistance au flétrissement bactérien clonés appartiennent à cinq classes différentes de protéines (tableau 5). Cette diversité de protéines exprimée par les gènes *R* illustre un large scénario possible de mécanismes au niveau moléculaire (Vikal and Bhatia 2017).

#### 4.2.1. Résistance à la BB conférée par la protéine kinase du récepteur LRR :

#### 4.2.2 Résistance à la BB conférée par la protéine de la classe de MtN3:

Le gène *xa13* exprime la protéine MtN3, un homologue de la noduline, qui lui confère la résistance aux protéines R connues (Chu et al. 2006). Les gènes *Xa21* et *Xa3 / Xa26* codent pour des protéines de la classe du récepteur kinase LRR impliquée dans la résistance au flétrissement bactérien. *Xa21* exprime un récepteur kinase doté d'un domaine extracellulaire putatif avec une LRR, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire avec une sérine / thréonine kinase (Song et al. 1995). La protéine *Ax21* ou *avrXa21* est sécrétée par *Xoo* via son système de sécrétion de type I pour activer le gène *Xa21* (Dai et al. 2007). Le locus *Xa21* est une famille de multigènes et plusieurs composants clés de la protéine *Xa21* tels que l'ubiquitine ligase E3 / XB3, WRKY62 / XB10, la protéine phosphatase 2C (PP2C) / XB15, ATPase / XB24 et Bip3 (également appelée protéine régulée par le glucose), impliqués dans la voie de signalisation de la défense ont été identifiés. L'ubiquitine ligase E3 interagit avec le domaine kinase de la protéine *Xa21* et joue le rôle de substrat pour l'activité de la sérine et de la thréonine kinase *Xa21*, qui est nécessaire à l'accumulation complète de la protéine *Xa21*, d'où l'immunité induite par *Xa21* (Wang et al. 2006). La protéine *Xa21* se lie à WRKY62 avec l'activité catalytique de son motif juxta-membranaire et de son domaine sérine / thréonine kinase. Les WRKY62 et WRKY76 (un autre facteur de transcription WRKY) fonctionnent comme un régulateur négatif de la résistance à la médiation de *Xa21* (Peng et al. 2008; Seo et al. 2011). Le composant PP2C interagit avec le motif juxta-membranaire et le domaine kinase de la protéine *Xa21* et peut déphosphoryler *Xa21* auto-phosphorylé, agissant ainsi en tant que régulateur négatif de la résistance induite par *Xa21* (Park et al. 2008).

Le locus *Xa3/Xa26* code pour une protéine de type kinase du récepteur LRR localisée dans la membrane plasmique avec un domaine LRR extracellulaire, un motif transmembranaire et un domaine cytoplasmique kinase (Sun et al. 2004). Le contexte génétique et le stade de développement du riz affectent la résistance conférée par *Xa3 / Xa26*. Ils sont plus efficaces chez japonica que sur fond génétique indica et leur expression augmente progressivement du stade plantule au stade adulte (Sun et al. 2004; Yang et al. 2003; Cao et al. 2007).

*Xa21* et *Xa3 / Xa26* appartiennent tous deux à une famille multigénique; codent pour le même type de protéines et ont une similarité de séquence de 53% (Song et al. 1995; Sun et al. 2004). La seule différence structurelle entre les deux gènes est le nombre de LRR, où *Xa26* code pour 26 LRR, alors que *Xa21* code pour 23 LRR (Song et al. 1995). Cependant, les domaines LRR respectifs de *Xa3 / Xa26* et *Xa21* sont des déterminants majeur de la reconnaissance spécifique de la race du pathosystème riz-*Xoo* (Zhao et al. 2009). Le domaine kinase de *Xa3 / Xa26* peut partiellement remplacer la fonction du domaine kinase de *Xa21*, ou inversement, dans la résistance à *Xoo*, suggérant la nature partiellement conservée de ce

domaine dans la voie de signalisation de défense (Zhao et al. 2009). Les gènes *Xa3* / *Xa26* et *Xa21* sont dépendants de la dose et leur expression augmente progressivement avec le stade nommés respectivement Os8N3 et OsSWEET11 (Yang et al 2006; Chen et al. 2010), codent pour des protéines membranaires identiques de la famille MtN3 / salive, mais présentent des différences de séquence cruciales dans leurs régions promotrices. *Xa13* (Os8N3/OsSWEET11) est également un gène de sensibilité induit par l'effecteur de type activateur de la transcription (TAL) PthXo1 de la souche *Xoo-PXO99* (Yang et al. 2006; Römer et al. 2010; Yuan et al. 2011, 13).

La protéine *Xa13* interagit avec deux protéines de type transporteur du cuivre, COPT1 et COPT5, pour favoriser l'élimination du cuivre dans les vaisseaux du xylème, où *Xoo* se multiplie et se propage pour provoquer une maladie (Yuan et al. 2010). Comme le *PXO99* ne peut pas induire *xa13* récessif, les niveaux de cuivre dans les plants de riz porteurs du gène *xa13* récessif peuvent inhiber la croissance de *Xoo* et ainsi provoquer une réaction de résistance des plantes.

La famille MtN3 / salive contient plus de 20 paralogues. Certaines protéines MtN3 / salive d'espèces différentes agissent en tant que transporteur de glucose (Chen et al. 2010, 2012). Le *Xa13*, en plus de jouer le rôle de gène de susceptibilité dans l'interaction riz-*Xoo* spécifique à la race, joue également le rôle de transporteur de saccharose.

#### 4.2.3. Résistance au flétrissement bactérien déclenchée par les effecteurs TAL :

Les effecteurs de type TAL agissent en général comme des facteurs de transcription induisant l'expression de gènes cibles parmi lesquels, les gènes de sensibilité (S) sont essentiels au développement de la maladie (Figure 19). Dans une interaction incompatible, deux principaux mécanismes de résistance impliquent les effecteurs de type TAL (Figure 25). Il s'agit, notamment, de la résistance provenant de la non-induction d'un gène cible, dit de sensibilité. On parle alors de « l'ETS compromise » ou de non déclenchement de la maladie (Hutin et al. 2015). De la résistance associée à l'induction d'un gène R dit exécuteur par un TAL (Figure 20). La protéine exprimée est un exécutant direct de la résistance (Bogdanove et al. 2010). On parle alors de «résistance de type TAL<sup>AD</sup>-ETI (TAL Activation Domain – ETI)» (Zhang et al. 2015).

##### 4.2.3.1. ETS compromise ou résistance associé à la perte de sensibilité:

L'ETS compromise est la résistance obtenue par défaut ou non déclenchement de la maladie. Trois gènes récessifs *xa5*, *xa13* (SWEET11) et *xa25* (SWEET13) illustrent ce mécanisme (Chu et al. 2006b; Iyer and McCouch, 2004; Liu et al. 2011; Zhou et al. 2015).

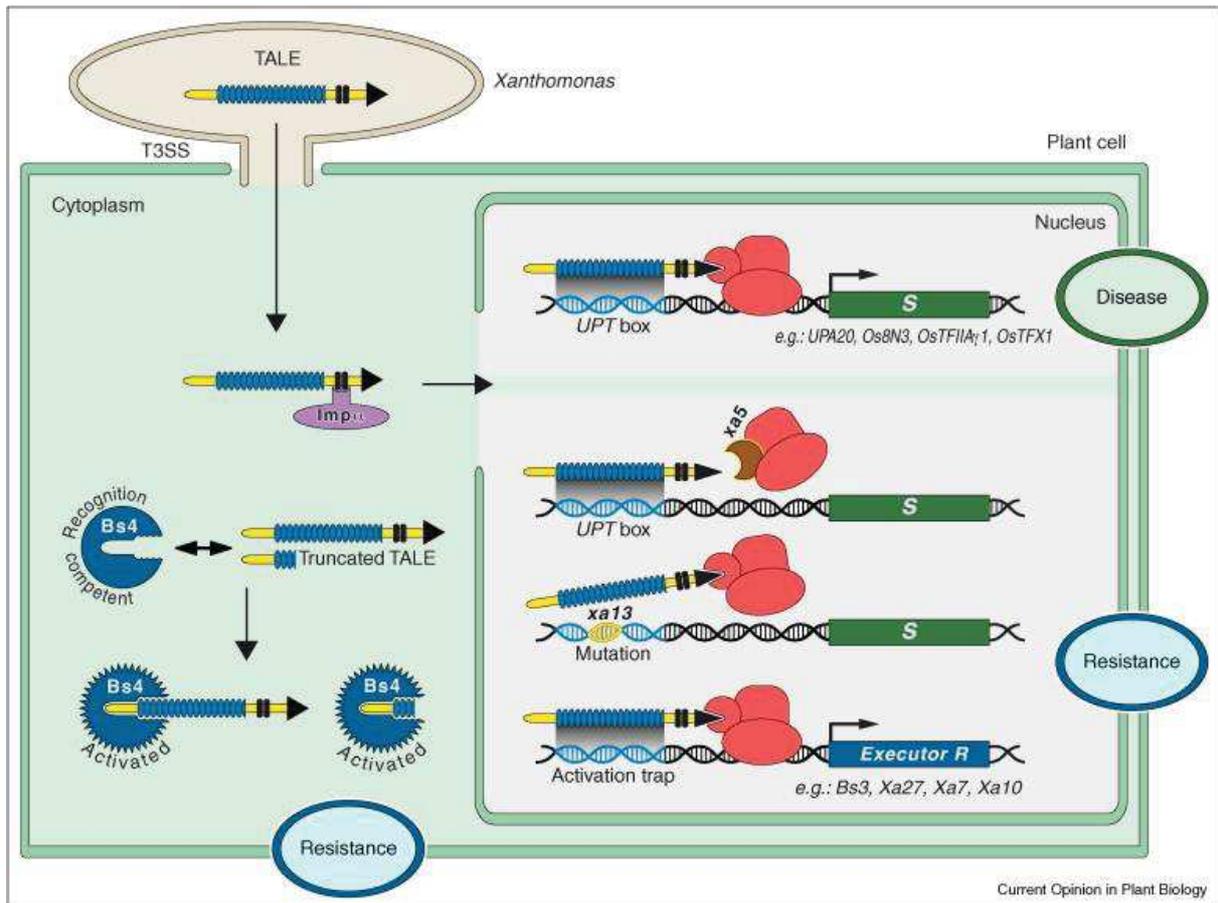


Figure 25: Les TALEs dans l'induction de la maladie et de la résistance chez les plantes: *Xanthomonas* injecte les TALE dans le cytoplasme de la cellule hôte via le système de sécrétion de type III (T3SS). Les TALE peuvent être détectés par des protéines de résistance dans le cytoplasme, comme démontré par la protéine Bs4 de type (LRR) NB-LRR de la tomate, qui détecte le TALE AvrBs4. En interaction avec l'importine  $\alpha$  (*imp $\alpha$* ), les TALE sont transloqués vers le noyau où ils se lient aux boîtes UPT (upregulated by TAL) correspondantes et déclenche la maladie en activant la transcription de gènes de sensibilité (S) correspondants de l'hôte tels que UPA20, Os8N3, OsTFIIA $\gamma$ 1 ou OsTFX1. L'activation des gènes S peut être supprimée soit par une variation du complexe de l'ARN polymérase II (formes rouges) tel que *xa5* (forme brune), soit par des mutations dans les boîtes UPT spécifiques (mutation *xa13*). En plus, les plantes ont développé des pièges à travers l'activation de gènes la résistance, parmi lesquels les exécuteurs (*Xa27* ou *Bs3*) sous le contrôle de la transcription des boîtes UPT normalement localisés dans les promoteurs du gène S. Source: Bogdanove et al. (2010).

Des polymorphismes dans les séquences des EBE des promoteurs des gènes de sensibilité sont susceptibles de compromettre l'interaction avec les effecteurs TAL et donc de conférer des résistances du à la non induction d'un gene nécessaire au développement de la maladie. La pression de sélection des effecteurs TAL pour l'induction du même gène cible pourrait positivement influencer cette variation allélique. Le polymorphisme des séquences des EBE des gènes S, *OsSWEET11* et *OsSWEET13*, a donné naissance à des allèles de résistance récessifs respectivement appelés *xa13* et *xa25* (Chu et al. 2006; Liu et al. 2011; Zhou et al. 2015). En effet, l'effecteur TAL PthXo1 de la souche *Xoo* PXO99 induit l'allèle sensible de *OsSWEET11/Xa13* et cause la maladie (Romer et al. 2010; Yang et al. 2006) (Figure 21). Par contre, les lignées de riz portant l'allèle de résistance *xa13* contrôlent *Xoo*PXO99 et la résistance observée s'explique par la non induction de *OsSWEET11* (Figure 22). Ce gène S est capitale au développement de la maladie (Yuan et al. 2009; Yuan et al. 2011). L'allèle récessif

de résistance *xa13* diffère de l'allèle dominant sensible *Xa13*, soit par une insertion, soit par une délétion ou par une substitution dans l'EBE du promoteur du gène (Romer et al. 2010). En guise d'exemple, une substitution au niveau du second nucléotide de l'EBE empêche l'induction d'*OsSWEET11* par *PthXo1*.

*OsSWEET13* aussi appelé *Xa25* est induit par l'effecteur TAL *PthXo2* de la souche de *Xoo PXO339* (Liu et al. 2011). Les plants de riz portant l'allèle récessif *xa25* qui diffère de *Xa25* par la délétion d'un seul nucléotide dans l'EBE de *PthXo2* contrôlent la souche *XooPXO339* (Zhou et al. 2015). En effet cette mutation empêche l'effecteur TAL *PthXo2* de se fixer sur l'EBE et donc l'induction du gène *S OsSWEET13*. Le transfert de l'allèle sensible dominant *Xa25* dans une lignée de riz portant l'allèle récessif *xa25* supprime la résistance à la souche *XooPXO339* (Liu et al. 2011).

Le gène *Xa5* code pour la sous-unité gamma du facteur de transcription IIA (TFIIA<sub>γ</sub>). Il diffère de son allèle récessif *xa5* par la substitution d'un seul codon (Val39 à Glu). Cette substitution est associée à la résistance de l'allèle récessif *xa5* aux souches *Xoo* portant *avrxa5* (Iyer and McCouch 2004).

#### 4.2.3.2. Résistance associée à l'activation d'un gène exécuteur :

La résistance de type TAL<sup>AD</sup>-ETI implique des protéines TALs qui agissent comme des facteurs d'avirulence, via l'activation d'un gène R de type exécuteur (E) qui confère à son tour la résistance à la plante (Figure 25) (Boch et Bonas, 2010; Bogdanove et al. 2010). Le gène R porte sur son promoteur, de motifs distincts, spécifiques à chaque effecteur, appelés boîtes UPT (régulées de manière positive par les TALE), qui dirigent l'interaction physique avec les TALE correspondants (Romer et al. 2009) et leur activation. Trois gènes de résistances au flétrissement bactérien, *Xa27*, *Xa10* et *Xa23*, sont dépendants des effecteurs (TAL) (Figure 23) (Gu et al. 2005b; Tian et al. 2014; Wang et al. 2015).

*Xa27*, le premier gène de résistance de type E cloné, code pour une protéine apoplastique de 113 acides aminés qui ne présente aucune similarité de séquence avec les protéines d'autres organismes que le riz (Wu et al. 2008). La protéine ainsi exprimée est toxique pour la cellule (Wu et al. 2008) et la résistance observée se caractérise par une HR qui bloque le développement de la maladie chez le riz. Les allèles résistants et sensibles de *Xa27* codent pour une protéine identique, mais différent par leur promoteur (Gu et al. 2005). Le gène *Xa27* a été localisé sur le chromosome 6 et reconnaît l'effecteur TALs *AvrXa27* (Romer et al. 2009). La résistance spécifique de *Xa27* dépend de la présence d'*AvrXa27*, un effecteur TAL qui induit une réaction de résistance en se liant à l'EBE du promoteur *Xa27* (Boch et al. 2009) (Figure 24). Cependant, l'induction de *Xa27* par *AvrXa27* était fortement atténuée dans un fond génétique homozygote pour *xa5* suggérant que cette induction serait dépendante du facteur de transcription générale *OstFIIAγ5* (Gu et al. 2009).

Le gène *Xa10* a également sur son promoteur, un élément de liaison pour l'effecteur TAL *AvrXa10* (EBE*AvrXa10*). En effet, l'effecteur *AvrXa10* induit spécifiquement l'expression du gène *E Xa10* (Tian et al. 2014). Le gène localisé sur le chromosome 11, code pour une protéine de 126 résidus d'acides aminés avec quatre hélices transmembranaires potentielles. Il a été identifié chez le cultivar de riz Cas209 et confère une résistance race-spécifique (Yoshimura 1983). *XA10* est une protéine inductible qui déclenche la mort cellulaire programmée par perturbation du réticulum endoplasmique (RE) et de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  cellulaire (Tian et al. 2014) entraînant du coup une forte HR (Figure 25) à tous les stades de développement (Gu et al. 2008). La résistance médiée par *Xa10* serait également atténuée dans un fond génétique homozygote pour *xa5* (Tian et al. 2014).

*Xa23* a été isolé chez *O. rufipogon* en utilisant une technologie de clonage et d'effecteur TAL (Wang et al. 2015). Il code pour une protéine de 113 acides aminés qui partage une identité de 50% avec la protéine R, *XA10*. Les hélices transmembranaires de *Xa23* se chevauchent également avec celles de *XA10*. Ces deux gènes pourraient être des homologues. Cependant, contrairement à *Xa10*, la transcription de *Xa23* est spécifiquement activée par *AvrXa23* (Wang et al. 2015; Wang et al. 2014). Le gène *Xa23* confère ainsi la résistance aux souches *Xoo* portant le gène TAL *avrXa23*. Le nombre important de souches porteuses d'*AvrXa23* fait de *Xa23* un gène exécuteur E avec un spectre de résistance très large (Wang et al. 2014a). De plus, l'allèle de sensibilité *xa23* présente un cadre de lecture ouvert identique à celui de *Xa23* mais diffère de région promotrice par l'absence de l'élément de liaison TALE (EBE) pour *AvrXa23*. L'induction de *Xa23* peut déclencher une forte réaction d'hypersensibilité (HR) chez le riz, à tous les stades de développement et bloque le développement de la maladie (Figure 25). La même réaction est observée chez le tabac et de la tomate (Wang et al. 2015).

#### 4.2.4. Résistance à la BB conférée par une protéine NBS-LRR :

*Xa1* est le seul gène de résistance BB de type NBS-LRR cloné à ce jour (Vikal and Bhatia 2017). Son expression est induite par une blessure et une infection pathogène (Yoshimura et al. 1998b). Les NBS-LRRs reconnaissent les effecteurs en réponse à l'infection causée par les agents pathogènes et induisent les réactions de résistance aux maladies en aval (Yue et al. 2012). *Xa38*, identifié sur *O. nivara*, est également de type NBS-LRR (Bhasin et al. 2012). Les gènes NBS-LRR code pour des protéines cytoplasmiques, avec un domaine de type NBS (Nucléotide-Binding Site) impliqué dans la fixation ou l'hydrolyse de nucléotides, et un domaine de type LRR (Leucine-Rich Repeat) composé d'un enchainement de motifs riches en leucine et impliqué dans les interactions protéine-protéine (Figure 26) (Collier et Moffett, 2009; Eitas et Dangl, 2010 ; Takken and Goverse, 2012). Il existe plusieurs types de protéines NBS-LRR en fonction de la variable N-terminal. La classe des CC-NB-LRR (CNL) possède un domaine de type CC (Coiled-Coil) associé aux interactions protéine-protéine, la liaison aux acides nucléiques et la transduction de signaux. Ces protéines sont conservées chez les dicotylédones et les monocotylédones. Ex : Pita chez le riz. Quant à la classe des TIR-NB-LRR

(TNL), ces protéines avec un domaine TIR (Toll-interleukin 1 receptor) ne sont présentes que chez les dicotylédones Ex: RPP5 d'Arabidopsis. Les domaines CC et TIR sont impliqués dans l'activation de la résistance et la signalisation de la mort cellulaire (Martin et al. 2003; Chisholm et al. 2006; McHale et al. 2006). Une troisième classe de protéine NB-LRR avec un domaine BNL (BED-finger) a été découvert chez *Populus trichocarpa* (Kohler et al. 2008; Duplessis et al. 2009). Dans le riz, la plupart des NBS-LRR appartiennent à la sous-classe CC-NBS-LRR (CNL)(Monosi et al. 2004; McHale et al. 2006). La majorité des protéines de résistance appartient à la famille des NB-LRRs. Plus de 400 gènes NBS-LRR ont été identifiés sur le génome *O. sativa* cv. Nipponbare (Liu et al. 2011). Cependant, bien que ces gènes soient associés à la résistance des plantes, les fonctions de la plupart d'entre eux restent inconnues chez le riz. Les gènes NBS-LRR ont la particularité d'évoluer très vite. Cette évolution est associée à la pression de sélection imposée par la présence et l'évolution des pathogènes.

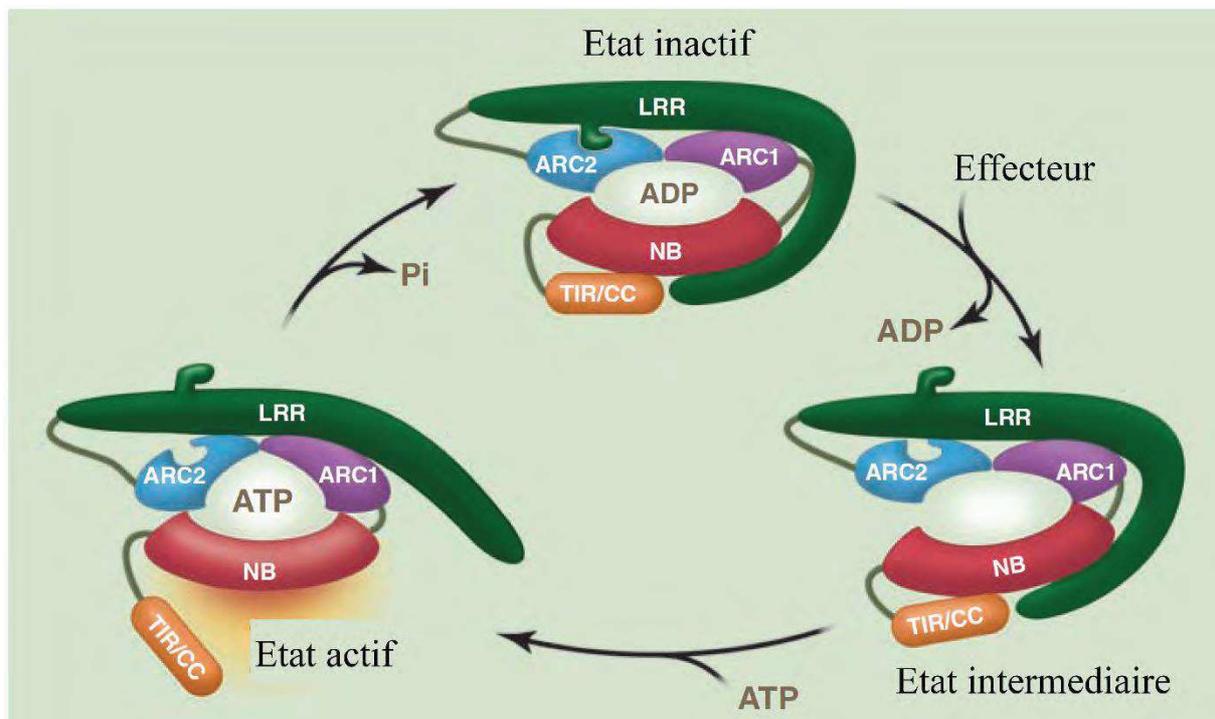


Figure 26: Activation des protéines de résistance de type NBS-LRR. La protéine R de type NBS-LRR reste dans un état inactif en absence d'effecteur spécifique. Cet état est stabilisé par le domaine LRR et s'explique par la liaison de la protéine R à l'ADP. En présence de l'effecteur, la protéine R évolue vers un état intermédiaire après la dissociation de l'ADP. L'énergie fournie à la protéine intermédiaire à la suite de sa liaison avec la molécule d'ATP entraîne l'activation de la protéine NBS-LRR qui initie une cascade de signalisation pour la mise en place de la HR (Takken and Tameling 2009).

#### 4.2.5. Résistance à la BB conférée par une autre classe de protéines exprimée par xa5 :

Le gène de résistance *xa5* à expression constitutive dans différents tissus et non dépendante de la dose, code pour une classe de protéine, la sous-unité gamma du facteur de transcription IIA (TFIIA $\gamma$ ), l'un des facteurs de transcription généraux impliqués dans la

transcription assurée par l'ARN polymérase II (Iyer and McCouch 2004; Jiang et al. 2006). TFIIA $\gamma$  est impliqué dans le recrutement de la machinerie de transcription basale par des facteurs de transcription eucaryotes. L'allèle *xa5* porte une mutation faux-sens qui n'influence pas sa fonction dans le recrutement du mécanisme de transcription basal (Jiang et al. 2006) mais peut être une source pour échapper aux fonctions de virulence de TAL (Jens Boch and Bonas 2010; Keyu Gu et al. 2009). En effet, il a été rapporté qu'*avrXa5* chez *Xoo* est un gène d'avirulence, qui code pour une protéine de type TAL, correspondant à *xa5* (Zou et al. 2010).

#### 4.3. Les gènes de résistance identifiés contre *Xanthomonas oryzae*:

La base génétique de la résistance du riz au flétrissement bactérien a été suffisamment étudiée et un standard différentiel a été établi pour permettre la comparaison des gènes identifiés, (Tsugufumi Ogawa 1993). Les 44 gènes de résistance (R) au flétrissement bactérien, désignés de *Xa1* à *xa44* (Kim et al. 2015; Cheema et al. 2008; Busungu et al. 2016; Kim 2018), ont été identifiés à partir d'espèces cultivées, de populations mutantes et de riz sauvage (Tableau 6). Ces gènes ont été cartographiés sur six des douze chromosomes du riz et se répartissent entre 29 dominants et 15 récessifs (*xa5*, *xa8*, *xa9*, *xa13*, *xa15*, *xa19*, *xa20*, *xa24*, *xa25*, *xa26b*, *xa28*, *xa31*, *xa32*, *xa33*, *xa34*, *xa42*, et *xa44*) (Tableau 6). Au total, neuf gènes codant pour différents types de protéines ont été clonés et caractérisés (*Xa1*, *Xa3* / *Xa26*, *xa5*, *xa13*, *Xa10*, *Xa21*, *Xa23*, *xa25* et *Xa27*), suggérant de multiples mécanismes de résistance pour le contrôle de *Xoo* (Song et al. 1995; Sun et al. 2004; Yoshimura et al. 1998b; Iyer and McCouch 2004; Gu et al. 2005a; Fu, et al. 2006; Liu et al. 2011; Wang et al. 2014). En général, ces gènes fournissent une résistance totale et spécifique aux races *Xoo* et sont utilisés en singleton ou en combinaison dans la sélection du riz pour la résistance à la maladie (Pandey et al. 2013). Une série de neuf gènes (*xa15*, *Xa16*, *Xa17*, *Xa18*, *xa19*, *xa20*, *xa26*, *Xa27*, *xa28*, *xa44*) a été obtenue par mutagenèse (traitement avec du N-méthyl-N-nitrosourea, ou par irradiation de neutrons thermiques, ou par mutagenèse somaclonale), laquelle avait différents niveaux de spectres de résistance (Ogawa and Yamamoto 2008; Ogawa 2008; Taura et al. 1992). Certains gènes de résistance ne sont efficaces qu'à l'âge adulte de la plante (par exemple *Xa21*), alors que la plupart (exemple *Xa23*, *Xa26*) semble ne pas être régulée par le développement de la plante. En général, *Xa3* porte le caractère de résistance à l'âge adulte de la plante mais efficace contre au moins une race de *Xoo* à tous les stades de croissance de la plante (Nino-Liu et al. 2006). *Xa21* et *Xa23* ont un large spectre de résistance contre les races *Xoo* d'Asie. Majoritairement, les autres gènes contrôlent quelques races avec très souvent une limite géographique donnée (Nino-Liu et al. 2006).

Aucun gène de résistance contre *Xoc* n'a encore été caractérisé chez le riz. Un gène dominant *Rxo1* a été isolé et caractérisé du maïs (Zhao et al. 2004). Ce transgène confère la résistance à *Xoc* quand il est exprimé chez le riz (Zhao et al. 2005a). Un second gène de résistance contre BLS mais récessif nommé *bls1* a été localisé sur le chromosome 6 de *Oryza rufipogon* (He et al. 2012).

Tableau 6: Focus sur les gènes de résistance au flétrissement bactérien du riz.

Genes Xa	Resistance aux races Xoo	cultivars donneurs	Chr	References
<b>Xa1</b>	Japanese race-I	Kogyoku, IRBB1	4	(Satomi Yoshimura et al. 1998b; S. Yoshimura et al. 1996)
<b>Xa2</b>	Japanese race-II	IRBB2	4	(Sakaguchi 1967; Q. He et al. 2006)
<b>Xa3/Xa26</b>	Chinese, Philippine, and Japanese races	Wase Aikoku 3, Minghui 63, IRBB3	11	(Xiang et al. 2006; Ezuka 1975)
<b>Xa4</b>	Philippine race-I	TKM6, IRBB4	11	(S Yoshimura et al. 1995; X. Sun et al. 2003)
<b>xa5</b>	Philippine races I, II, III	IRBB5	5	(Iyer and McCouch 2004; Blair et al. 2003)
<b>Xa6</b>	Philippine race 1	Zenith	11	(Sidhu 1978)
<b>Xa7</b>	Philippine races	DZ78	6	(Sidhu, Khush, and Mew 1978; S. Chen et al. 2008)
<b>xa8</b>	Philippine races	PI231128	7	(Vikal et al. 2014)
<b>xa9</b>	Philippine races	Khao Lay Nhay and Sateng	11	(Singh, Khush, and Mew 1983)
<b>Xa10</b>	Philippine and Japanese races	Cas 209	11	(A. Yoshimura 1983; K Gu et al. 2008)
<b>Xa11</b>	Japanese races	IB, II, IIIA, V IR8	3	(T. Ogawa and Yamamoto 2008; Goto et al. 2009)
<b>Xa12</b>	Indonesian race V	Kogyoku, Java14	4	(T Ogawa et al. 1978)
<b>xa13</b>	Philippine race 6	BJ1, IRBB13	8	(Chu, Fu, et al. 2006; B. Yang, Sugio, and White 2006)
<b>Xa14</b>	Philippine race 5	TN1	4	(SiYuan, MingPu, and XingHua 2010)
<b>xa15</b>	Japanese races	M41 mutant	–	(Nakai et al. 1998)
<b>Xa16</b>	Japanese races	Tetep	–	(Noda and Ohuchi 1989)
<b>Xa17</b>	Japanese races	Asominori	–	(Ogawa et al 1989)
<b>Xa18</b>	Burmese races IR24	Miyang23, Toyonishiki	–	(T. Ogawa and Yamamoto 2008)
<b>xa19</b>	Japanese races	XM5 (mutant of IR24)	–	(S Taura et al. 1991)
<b>xa20</b>	Japanese races	XM6 (mutant of IR24)	–	(Satoru Taura et al. 1992)
<b>Xa21</b>	Philippine and Japanese races	O. longistaminata, IRBB21	11	(W.-Y. Song et al. 1995; Ronald et al. 1992)
<b>Xa22</b>	Chinese races	Zhachanglong	11	(Chuntai Wang et al. 2003)
<b>Xa23</b>	Indonesian races	O. rufipogon (CBB23)	11	(Zhang et al. 1998, 2001)
<b>xa24(t)</b>	Philippine and Chinese races	DV86	2	(Mir and Khush 1990; X. Wu et al. 2008)

<b><i>xa25/Xa25(t)</i></b> <b><i>Xa25</i></b>	Chinese and Philippine races	Minghui 63, HX-3 (somaclonal mutant of Minghui 63)	12	(Amante-Bordeos et al. 1992; K. S. Lee et al. 2003)
<b><i>xa26(t)</i></b>	Philippine races	Nep Bha Bong	–	(K. S. Lee et al. 2003)
<b><i>Xa27</i></b>	Chinese strains and Philippine race 2 to 6	<i>O. minuta</i> IRGC 101141, IRBB27	6	(K. Gu et al. 2004; Amante-Bordeos et al. 1992)
<b><i>xa28(t)</i></b>	Philippine race2	Lota sail	–	(K. S. Lee et al. 2003)
<b><i>Xa29(t)</i></b>	Chinese races	<i>O. officinalis</i> (B5)	1	(Tan et al. 2004)
<b><i>Xa30(t)</i></b>	Indonesian races	<i>O. rufipogon</i> (Y238)	11	(Xuwei, Chunlian, and Qing 2007)
<b><i>xa31(t)</i></b>	Chinese races	Zhachanglong	4	(C Wang et al. 2009)
<b><i>Xa32(t)</i></b>	Philippine races	<i>Oryza australiensis</i> (introgression line C4064)	11	(Zheng et al. 2009)
<b><i>xa33(t)</i></b>	Thai races	Ba7 <i>O. nivara</i>	6	(Korinsak et al. 2009)
<b><i>xa34(t)</i></b>	Thai races	Pin Kaset <i>O. brachyantha</i>	–	(Chen et al. 2011)
<b><i>Xa35(t)</i></b>	Philippine races	<i>Oryza minuta</i> (Acc. No.101133)	11	(SiBin, DuanPin, and XingHua 2010)
<b><i>Xa36(t)</i></b>	Philippine races	C4059	–	(LiLi et al. 2010)
<b><i>Xa38</i></b>	Indian Punjab races	<i>O. nivara</i> IRGC81825	–	(Cheema et al. 2008)
<b><i>Xa39</i></b>	Chinese and Philippines races	FF329	11	(F. Zhang et al. 2015)
<b><i>Xa40(t)</i></b>	Korean <i>Xoo</i> races	IR65482-7-216-1-2	11	(Suk-Man Kim et al. 2015)
<b><i>xa41(t)</i></b>	Various <i>Xoo</i>	strains Rice germplasm	–	(Hutin, Sabot, et al. 2015)
<b><i>xa42</i></b>	Japanese <i>Xoo</i> races	XM14, a mutant of IR24	3	(Busungu et al. 2016, 2018)
<b><i>Xa43(t)</i></b>	Korean <i>Xoo</i> races	P8 (Colombia XXI; IRGC: 126955)	11	(Suk-Man Kim and Reinke 2019)
<b><i>xa44(t)</i></b>	Korean <i>Xoo</i> races	IR73571-3B-11-3-K3	11	(Suk-Man Kim 2018)

Source: (Vikal and Bhatia 2017; Verdier et al. 2012)

## V. De l'identification des QTLs par la génétique d'association à la confirmation des loci candidats:

L'utilisation de la génétique d'association à l'échelle du génome complet (Genome-Wide Association Studies ou GWAS, ou encore Association mapping) pour identifier les gènes susceptibles de conférer la résistance aux plantes suscite un vif intérêt. Les progrès de la génomique, des analyses de la diversité naturelle et le développement des outils d'analyses statistiques rendent la génétique d'association attrayante pour les programmes d'amélioration variétale. Contrairement à l'approche QTL classique, l'approche GWAS ne nécessite pas de création de populations bi-parentales de cartographie de grande taille (Morgante and Salamini 2003), mais se base sur des populations naturelles ou des panels de

diversité. Elle offre ainsi une résolution génétique potentielle de haut niveau grâce aux nombreux événements de recombinaison qui ont pu avoir lieu au sein de la diversité de cultivars étudiés et permet de suivre plusieurs allèles fonctionnels par locus. Un facteur important à considérer lors des études d'association est le niveau de déséquilibre de liaison (DL) des génotypes étudiés.

### 5.1. Détection de QTLs par la génétique d'association (GWAS):

La génétique d'association localise les loci à caractères quantitatifs (QTL) en examinant les associations marqueur-trait qui peuvent être attribuées à la force du déséquilibre de liaison entre les marqueurs et les polymorphismes fonctionnels dans un ensemble de variétés au matériel génétique varié (Zhu et al. 2008). Elle repose sur une relation triangulaire entre le phénotype d'intérêt, le locus causal de la variation observée et un marqueur en déséquilibre de liaison (DL) avec le locus causal (Balding 2006). Il s'agit de rechercher dans un ensemble de génotypes (accessions de germplasm), une association statistique de haute résolution (test de significativité par pvalue) entre la variation du phénotype ou du caractère d'intérêt et les différents allèles présents au niveau de chaque marqueur ou gènes candidats.

Elle se déroule en trois phases essentielles:

- ✓ le screening de la diversité phénotypique de la population pour le caractère d'intérêt,
- ✓ le génotypage des accessions de la population étudiée qui passe généralement par une phase préalable de séquençage NGS (Next-Generation Sequencing) des accessions (reséquençage ou génotypage par séquençage (GBS)), suivi d'une étape de SNP calling permettant d'identifier les polymorphismes de type SNPs et indels
- ✓ une analyse d'association à haute résolution (GWAS ou étude d'association à l'échelle du génome) confrontant les données de phénotypage et de génotypage grâce à un logiciel de cartographie d'association de traits complexes.

Il existe plusieurs logiciels de GWAS. Certains sont capables de gérer et corriger les effets de confusion apportés par la structure de la population ou encore par l'apparentement entre les variétés du panel. Notamment, le logiciel libre TASSEL (Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage), met en œuvre des approches de modèle linéaire général (GLM) et de modèle linéaire mixte (MLM) pour contrôler ces effets avant de permettre la visualisation graphiquement des statistiques d'association entre chaque marqueur et le caractère étudié. La prise en compte de la structure des populations dans les modèles d'association permet d'éviter les faux positifs (Yu et al. 2006). Pour mieux choisir le modèle le plus adéquat, la distribution des tests statistiques générés par GWAS est généralement observée sous la forme de quantile-quantile (Q-Q) plot (Figure 27). La déviation observée ou l'inflation des p-values ne doit pas être trop grande par rapport au modèle neutre, qui correspond finalement à la situation où aucun marqueur génétique ne peut expliquer le phénotype (Figure 27). Les SNPs

ou Indels associés de manière significative au caractère d'intérêt se détachent des autres sur le Q-Q plot (Figure 27) en queue de courbe et constituent également un pic au niveau d'un autre type de graphique résultant du GWAS: le Manhattan plot (Figure 28). Ces pics constituent la distribution des effets des SNP/Indel généré par le modèle de GWAS le long du génome. Les auteurs utilisent différents seuils de significativité (Gao et al. 2008; Moskvina and Schmidt 2008; Churchill and Doerge 1994). Cette approche de GWAS est appliquée avec succès sur les populations d'individus non apparentés dont les recombinaisons observées sont historiques.

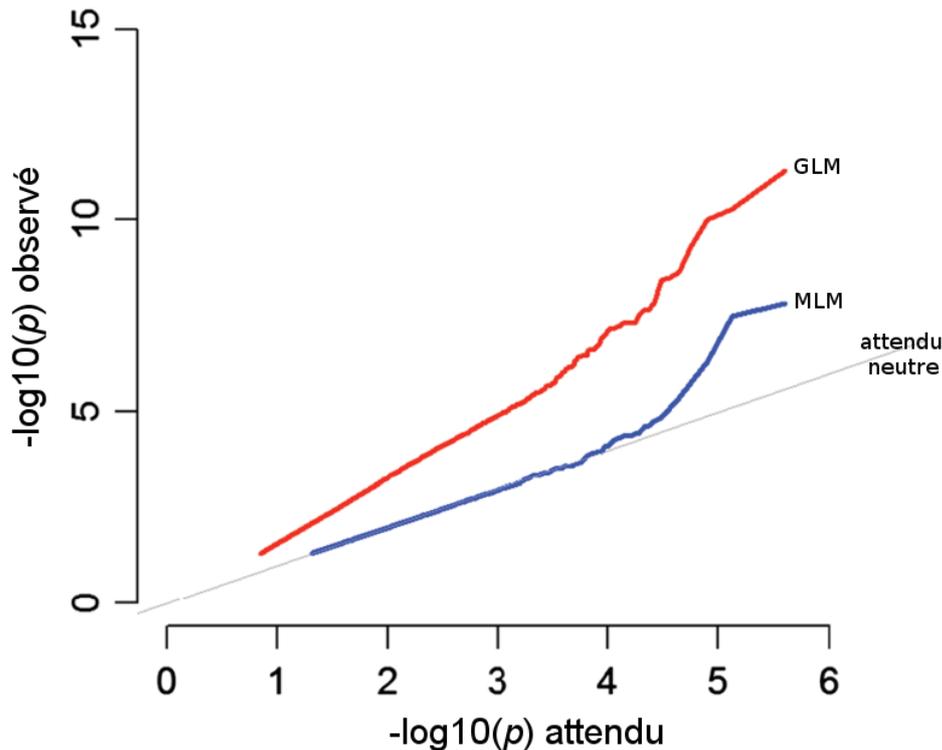


Figure 27: Q-Q plot de GLM et MLM sur les mêmes données. Le modèle GLM présente une forte inflation des p-values (en rouge) comparé à l'attendu neutre (en gris). Le modèle MLM réduit fortement cette inflation (en bleu). Les marqueurs les plus associés au caractère d'intérêt montrent une déviation par rapport à l'attendu neutre D'après (Korte and Farlow 2013).

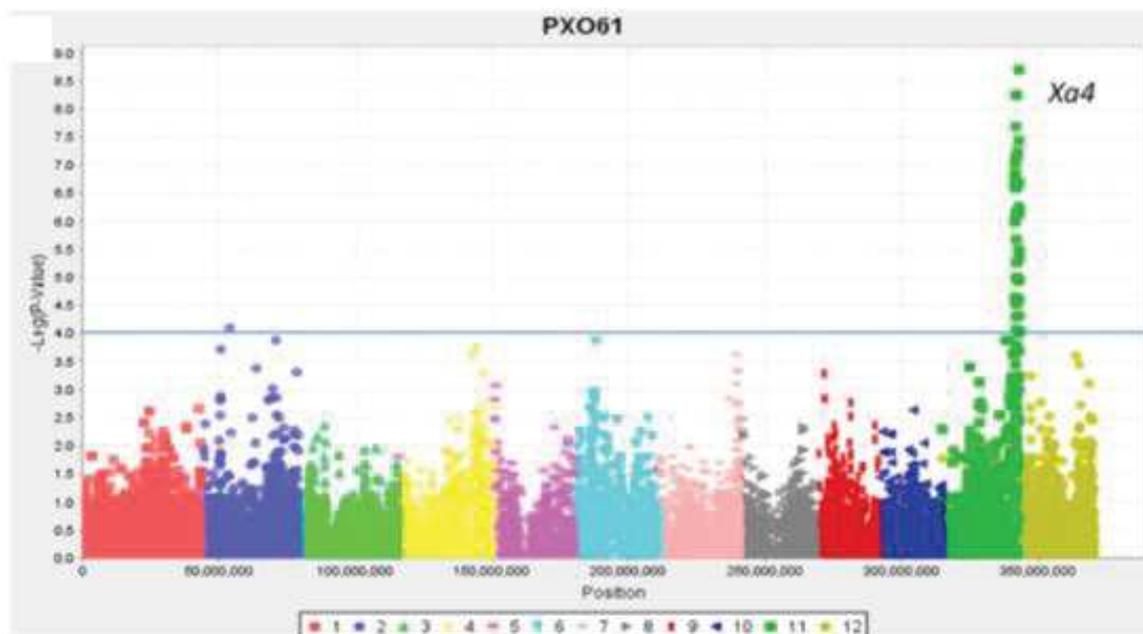


Figure 28: Manhattan plot (MLM) illustrant l'analyse GWAS de résistance du Riz à la souche Xoo PXO61 de la race 1 des Philippines. Cette souche a été utilisée pour cribler le sous-ensemble de lignes indica MAGIC en plus des 8 parents au stade tallage maximum dans la serre de criblage à l'IRRI. Le niveau le plus important des associations avec les SNP (pic) est observé sur le chromosome 11 pointant vers Xa4. Il en résulte que la majorité des 200 lignées testées portaient le gène Xa4 avec 52 marqueurs SNP significativement associés parmi lesquels 51 étaient observés sur le chromosome 11 (position physique 27,7 Mb; marqueur  $R^2 = 0,28$ ) à la position du gène Xa4 (W. Wang et al. 2001). Le GWAS permet ici de détecter Xa4 en réponse à Xoo-PXO61. L'axe des abscisses indique les positions sur les chromosomes 1 à 12. L'axe des ordonnées porte les valeurs de Pvalue ( $-\log_{10}$ ) des marqueurs SNP. Les seuils de valeur  $p < 0,0001$  sont indiqués par le trait plein en gris (Bandillo et al. 2013)

## 5.2. Identification de gènes candidats:

Les QTLs identifiés ont un intervalle de confiance relativement large de plusieurs centimorgans. Pour accéder au contenu en gènes de la région candidate, on utilise les annotations structurales et fonctionnelles de la séquence génomique de référence, identifiant les bornes des gènes et leurs structures introns/exons. Chez le riz, il existe plusieurs génomes de références disponibles, le cultivar 93-11 pour indica (Yu et al. 2002) et MSU v7 japonica (Kawahara et al. 2013), etc. Un gène est candidat lorsqu'il cosegrége avec le QTL (gène candidat positionnel) ou lorsque sa fonction biochimique est en relation avec la physiologie du caractère étudié (gène candidat fonctionnel) (Pflieger et al. 2001). On l'accorde plus de poids lorsque le marqueur associé est situé à l'intérieur d'un gène dont la fonction est en relation avec le caractère étudié, et que le marqueur provoque une modification de la protéine associée (SNP non-synonyme, gain de codon stop, etc). Les gènes candidats peuvent être obtenus à partir des résultats sur les organismes modèles tels. Trois QTL associés à la date de floraison (Hd1, Hd3a, Hd6) chez le riz ont été identifiés sur la base de la validation de leur fonction chez *Arabidopsis thaliana* (Yano et al. 2000; Takahashi et al. 2001; Kojima et al. 2002)

### 5.3. Validation des gènes candidats :

La validation fonctionnelle est indispensable après l'identification des gènes candidats, pour mettre en évidence l'implication du gène candidat dans l'expression du phénotype d'intérêt. Il existe plusieurs approches de validation fonctionnelle de gène candidat parmi lesquelles l'une des plus puissantes et des plus utilisées s'appuie sur la suppression des gènes candidats via des modifications génétiques stables. L'interférence ARN (ARNi) est une technique d'extinction de gène qui est utilisée avec succès pour étudier la fonction des gènes dans plusieurs organismes. Ces approches de silençage des gènes induites par l'ARN sont très efficaces pour la validation fonctionnelle des gènes de plantes à l'échelle du génome (Waterhouse and Helliwell 2003).

D'autres approches utilisent la complémentation génétique de mutants connus (Doebley et al. 1997), la génétique inverse (Maes *et al.* 1999), surtout en utilisant la méthode TILLING (ciblage des lésions locales induites dans les génomes ou en Anglais, *targeting induced local lesions in genomes*) qui associe l'efficacité de la mutagenèse induite chimiquement à la capacité de la chromatographie en phase liquide à haute performance (DHPLC : denaturing high-performance liquid chromatography) (McCallum et al. 2000). Tout comme l'ARNi, le TILLING est également très puissant et très informatif car les modifications qu'ils induisent dans la fonctionnalité du gène sont comparables à celles naturellement observées.

# Projet de thèse

# Projet de thèse

## I. Introduction générale:

Le riz est la principale source de calories pour la moitié de la population mondiale. En Afrique, la croissance démographique et les modifications des habitudes alimentaires associées aux changements des modes de vie ont favorisé une augmentation de la demande de riz au détriment des cultures vivrières traditionnelles. Il est important d'améliorer les capacités de production rizicole pour couvrir les besoins et assurer une indépendance alimentaire garante d'une certaine stabilité économique. Le riz est une céréale massivement cultivée et occupe une position unique parmi les plantes d'intérêt agronomique au Mali. Sa productivité a plus que doublé depuis 2007 <http://www.fao.org/docrep>.

Cependant, une des contraintes majeures à la productivité du riz reste les maladies bactériennes à *Xanthomonas oryzae*, le flétrissement bactérien (BB) et la strie foliaire (BLS) respectivement causée par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) (Leyns et al. 1984). BB est la maladie la plus répandue et la plus dévastatrice. L'importance de cette maladie est devenue prépondérante à partir des années 60 quand les variétés à haut rendement ont été adoptées (Mew 1987; Ouedraogo et al. 2008; Agarwal et al. 1994). Le BB a été signalé pour la 1<sup>ère</sup> fois dans les années 80 au Mali (Buddenhagen et al. 1979), puis en Mauritanie, en Gambie, au Burkina Faso, au Niger, au Nigéria, au Sénégal, au Cameroun, au Gabon (Verdier et al. 2012) ainsi qu'au Bénin et au Togo (Afolabi et al. 2015). Le BB a été signalé aux Philippines en 1950 (MEW and Misra 1994; Swings et al. 1990). Plusieurs niveaux de pertes de production associés au BB ont été rapportés. Ces pertes oscillent entre 20-50%, et atteignent 80% dans les cas de graves épidémies (Mew 1987). Bien que la bactériose à stries foliaires (BLS) ait un impact sur le rendement moins important que le BB, des pertes de 5 à 30% ont été signalées (Soto-Suárez et al. 2010). La maladie a été décrite pour la première fois aux Philippines en 1918 et est répandue en Asie (Ou 1985), ainsi qu'en Afrique, notamment au Nigeria, au Sénégal, au Burkina Faso (Wonni et al. 2010), au Mali (Gonzalez et al. 2007) et plus récemment, en Uganda (Afolabi et al. 2014), Madagascar (Poulin et al. 2014), Burundi (Afolabi et al. 2014) et Kenya (Onaga et al. 2017). Au Mali, les variétés les plus cultivées dans la zone de l'Office du Niger [Adny11, Gambiaka suruni (Kogoni91-1), BG 90-2, etc.] sont décrites comme sensibles aux bactérioses (Sarra et al. 2010).

Pour établir une interaction compatible avec le riz, *Xoo* et *Xoc* s'appuient sur un système de sécrétion de type III (T3SS) pour transloquer les effecteurs de type TAL (Transcription Activator-Like) à l'intérieur de la cellule hôte. Une fois délivrées dans la cellule, les protéines effectrices fonctionnent comme des facteurs de transcription de plantes via un domaine de liaison à l'ADN cible programmable. Elles modulent ainsi les réponses immunitaires pour faciliter les processus nutritionnels ou de virulence de l'agent pathogène

(Boch et al. 2014; Boch et al. 2010; Bogdanove et al. 2010). Les souches africaines de *Xoo* possèdent en général un nombre réduit de neuf effecteurs TAL (Gonzalez et al. 2007) par rapport aux souches asiatiques qui en possèdent de 16 à 19 (Grau et al. 2016; Salzberg et al. et al. 2008). Les souches *Xoc* en possèdent jusqu'à 28 (Wilkins et al. 2015; Bogdanove et al. 2011).

Plusieurs méthodes de lutte ont été développées contre les maladies bactériennes causées par *Xoo* et *Xoc* mais la plus efficace et la plus économique est, de nos jours, l'utilisation de variétés résistantes (Vera Cruz et al. 2000; Verdier et al. 2012). Environ 44 gènes de résistance (R), dénommés *Xa1* à *Xa4* (Vikal and Bhatia 2017), conférant une résistance contre différentes souches de *Xoo*, ont été identifiés chez des espèces cultivées (*indica* et *japonica*), des populations mutantes ainsi qu' à partir de riz sauvage tels que *O. longistaminata*, *O. barthii*, *O. rufipogon*, *O. minuta* et *O. officinalis* (Vikal and Bhatia 2017; Hutin et al. 2015). Sur les 44 gènes *Xa* identifiés à ce jour, 15 sont récessifs, 29 dominants et 9 gènes (*Xa1*, *Xa3* / *Xa26*, *xa5*, *Xa10*, *xa13*, *Xa21*, *Xa23*, *xa25* et *Xa27*) ont été clonés et caractérisés au niveau moléculaire et codent pour différents types de protéines (Vikal and Bhatia 2017). Ainsi, contrairement aux autres pathosystèmes du riz, les gènes *Xa* peuvent être classés en catégories fonctionnelles distinctes et seul un petit nombre semble coder pour les protéines NBS-LRR (Boch et al. 2014). Les gènes *Xa4*, *xa5*, *xa13* et *Xa21* sont les plus utilisés dans les programmes de sélection en Asie (Khan et al. 2014). Certains gènes de résistance ne sont efficaces qu'à l'âge adulte de la plante (par exemple *Xa21*), alors que la plupart (exemple *Xa23*, *Xa26*) semblent ne pas être régulés par le développement de la plante. Cependant, *Xa3* confère généralement une résistance dans la plante à l'âge adulte et est efficace contre au moins une race de *Xoo* à tous les stades de croissance de la plante (Niño-Liu et al. 2006). Les gènes *Xa21* et *Xa23* ont un large spectre de résistance contre les races *Xoo* asiatiques tandis que les autres gènes sont efficaces à une ou quelques races qui peuvent être limitées à une aire géographique donnée (Niño-Liu et al. 2006).

En Asie, des lignées isogéniques de riz ("Near isogenic lines", NILs) portant chacune un gène R, ont été développées sur fond génétique IR24 pour caractériser les races des populations de *Xoo* (Tsugufumi Ogawa 1993). Actuellement, plus d'une trentaine de races de *Xoo* ont pu être caractérisées en Asie (Triplett et al. 2014; Mew 1987), parmi lesquelles une dizaine de races aux Philippines (Mew et al. 1992). Aux USA, aucune structure de race de *Xoo* n'a été caractérisée de nos jours. Par ailleurs, de nouvelles races apparaissent au Japon, Philippines, Nepal, Sri-Lanka, Corée et en Inde (Adhikari et al. 1999; Ochiai et al. 2000; Jeung et al. 2006; Lore et al. 2011). L'apparition de ces nouvelles races est due au contournement des gènes de résistance déployés (Vera Cruz et al. 2000). Aux Philippines, la fréquence et la distribution des races et des groupes génétiques de *Xoo* ont changé suite à l'introduction de variétés portant le gène de résistance *Xa4* compatible avec la race 2 (Mew et al. 1992; Ardales et al. 1996). Des études ont montré que l'adaptation d'une souche avirulente à son hôte, contenant un gène R majeur et unique, est souvent le résultat de la perte de fonction du gène *avr* (Vera Cruz et al. 2000). En Chine, l'utilisation à grande échelle du gène de résistance *Xa4* a

causé une forte pression de sélection sur la population pathogène, entraînant une augmentation spectaculaire de la fréquence de la race V qui est à la fois virulente sur les cultivars portant les gènes *Xa4* et *Xa3* (Zhou et al. 2011). Aussi, la plupart des lignées parentales des hybrides utilisées en Chine sont sensibles à la plupart des races *Xoo* du pays et des Philippines (Zhihui et al. 2009). Contrairement aux souches *Xoo*, aucune race n'a été rapporté pour les souches *Xoc* du fait de l'absence de gènes R majeurs disponibles (Vera Cruz et al. 1984). En effet, aucun gène de résistance contre *Xoc* n'a encore été caractérisé chez le riz (Zhao et al. 2004). Seul un gène dominant appelé *Rxo1* isolé et caractérisé à partir du maïs (Zhao et al. 2004) confère la résistance à *Xoc* en empêchant son développement dans la plante (Zhao et al. 2005). Récemment, un gène de résistance récessif nommé *bls1* a été localisé sur le chromosome 6 de *Oryza rufipogon* (He et al. 2012).

La réaction de ces gènes R par rapport aux isolats africains n'est pas suffisamment bien connue (Jeung et al. 2006; Lee et al. 2003). En Afrique, peu de travaux ont été effectués sur BB et BLS. Quelques souches africaines de *X. oryzae* ont été caractérisées (Gonzalez et al. 2007). Il en résulte que les souches africaines de *Xoo* se distinguent de celles d'Asie et d'Amérique tant dans leur profil de virulence (race) que génétiquement (Poulin et al. 2015; Zhao et al. 2012). Aussi, la probabilité pour que les gènes de résistance qui contrôlent la bactériose en Asie soient efficaces contre les souches africaines de *X. oryzae spp* est faible.

Il est donc intéressant de faire de nouvelles prospections dans les grands centres de riziculture au Mali en vue d'évaluer l'incidence des maladies, et de mettre en place une importante collection de souches bactériennes. La fréquence et la répartition géographique des races et/ou groupes de virulence des *Xoo* et *Xoc* à l'échelle du pays, permettra d'orienter plus finement un programme d'évaluation de la résistance variétale. Il demeure urgent de tester différentes populations de riz pour l'identification des sources de résistance (QTLs et gènes) à large spectre contre le BB et le BLS au Mali. .

La présente étude, fruit de la collaboration entre le Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA)/Mali, et l'UMR IPME de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) se justifie par l'importance des dégâts causés par les deux maladies au Mali et la nécessité de développer des variétés élites de riz possédant un bon niveau de résistance à ces bactérioses. Le sujet traité ici porte sur l'étude de la diversité des souches de *X. oryzae* et l'identification des sources de résistance du riz au BB et BLS en vue de les incorporer dans un programme d'amélioration de la résistance variétale de riz au Mali.

L'[objectif général de la thèse](#) est de contribuer à l'amélioration variétale pour la résistance du riz au Mali en proposant aux sélectionneurs des sources de résistance contre le BB et le BLS.

**Le chapitre 1** porte, dans sa première partie, sur une revue de littérature sur les connaissances générales du riz, sa culture, sa domestication, sa distribution géographique avec un accent particulier sur le Mali, les avancées sur la génomique du riz ainsi qu'une brève description des différentes populations de riz développées et utilisées en amélioration. La

deuxième partie de ce chapitre est consacrée à une synthèse des connaissances sur les contraintes biotiques liées à la production rizicole et plus spécifiquement sur les bactérioses (vasculaire et strie foliaire). La troisième partie porte sur les avancées scientifiques de ces dernières années sur l'étude des interactions entre *Xoo*, *Xoc* et le riz.

**Les chapitres 2, 3, 4 et 5** sont consacrés aux résultats acquis au cours de ma thèse.

**Le chapitre 2** porte sur la caractérisation de nouvelles races de *Xoo* au Mali et comment celle-ci nous informe sur les gènes de résistance à déployer. Cet article est publié dans le journal «Phytopathology ». Il présente en première partie, les travaux sur les prospections réalisées dans les principaux centres rizicoles du pays, les observations portées sur le terrain, la mise en place d'une collection des souches de *Xoo*, l'évaluation de la virulence de ces agents pathogènes sur la lignée de riz sensible témoins à la bactériose. La seconde partie du chapitre 2 est consacrée à la caractérisation et la répartition géographique (suivant les sites de collecte) des races de *Xoo* isolées au Mali entre 2010 et 2014. Ces travaux ont été menés au Mali sur des lignées de riz isogéniques (NILs/IRBB) afin de caractériser les gènes de résistance potentiellement utilisables en amélioration variétale. La troisième partie porte sur l'analyse de la résistance d'un panel de 29 variétés de riz cultivées aux souches de *Xoo* du Mali.

**Le chapitre 3** porte sur la caractérisation des *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* au Mali et l'identification des sources de résistance du riz à la strie foliaire. Il présente en première partie, les travaux sur la mise en place d'une collection malienne de *Xoc* doublement conservé au LBMA et à l'IRD/Montpellier, l'évaluation de la virulence de cette population bactérienne sur la lignée de riz sensible témoins Kitaake. La seconde partie est consacrée sur le criblage de 29 variétés de riz cultivé au Mali pour leur résistance/sensibilité aux isolats de *Xoc*. Il est écrit sous forme d'article et sera soumis au journal « Plant Disease »

**Le chapitre 4** est consacré à l'étude du déterminisme génétique de la résistance et de sa variation allélique en utilisant une population de riz MAGIC *indica*. L'article est publié dans « Plant Biotechnology Journal ». Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'IRD, le LBMA et deux équipes de recherche l'une aux états-unis (Colorado State University) et l'autre à l'Institut International de Recherche sur le Riz (IRRI) aux Philippines.

**Le chapitre 5** porte sur l'identification des QTLs et gènes à large spectre de résistance dans un panel de lignées représentatives de la diversité mondiale du riz *indica*. Il est présenté sous forme d'article et sera soumis à « Plant Biotechnology Journal ». Le screening variétal de 258 lignées de riz *indica* issues du projet 3K (et sélectionnées selon leurs origines géographiques) pour la résistance au BB et au BLS est décrit, suivi des analyses d'association par GWAS des données phénotypiques et génotypiques des 258 lignées afin d'identifier les QTLs impliqués. La région génomique du QTL majeur est déterminée permettant ensuite l'identification des gènes R candidats qui cosegrégent avec le QTL (gène candidat positionnel) et dotés d'une fonction biochimique en relation avec la physiologie de la résistance du riz (gène candidat fonctionnel).

**Enfin, le dernier chapitre (6)** présente une discussion générale sur l'ensemble des principaux résultats suivie **des conclusions et des perspectives générales** pour les travaux futurs.

## Chapitre 2

L'étude de la diversité phénotypique des souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* révèle l'existence de nouvelles races et renseigne sur les sources de résistance à déployer pour le contrôle de la bactériose foliaire au Mali

## Chapitre 2 : L'étude de la diversité phénotypique des souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* révèle l'existence de nouvelles races et renseigne sur les sources de résistance à déployer pour le contrôle de la bactériose foliaire au Mali.

Article publié dans la revue *Phytopathology*

**Tekete C**, Cunnac S, Doucouré H, Dembele M, Keita I, Sarra S, Karim D, Koita O, Verdier V. (2019). Characterization of new races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Mali informs Resistance gene deployment. *Phytopathology* DOI:10.1094/PHYTO-02-19-0070-R

### Implication personnelle

J'ai participé à toutes les phases de cette étude : concept et mise en œuvre du projet, missions de collectes, travail en laboratoire (isolement des bactéries, identification par PCR, mise en collection), travail en serre et au champ (tests de races, évaluation de la résistance variétale), l'analyse des données ainsi que la rédaction de l'article.

### 1. Contexte

Le Mali est le deuxième pays producteur de riz après le Nigeria dans la zone ouest Africaine avec environ 3 millions de tonne en 2018 (FAO, 2018). Cependant, la plupart des variétés cultivées au pays sont sensibles au flétrissement bactérien (Sarra et al. 2010), causé par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). La résistance variétale est le moyen de contrôle de la maladie le plus efficace et le plus respectueux de l'environnement. La diversité pathotypique des isolats de *Xoo* est un prérequis nécessaire pour l'identification des sources de résistance à large spectre contre la bactériose. Pour suivre l'évolution de la structure des populations de *Xoo* dans les pays producteurs de riz, l'IRRI et ses partenaires ont développé des lignées de riz quasi-isogéniques différentielles, appelées NILs (Near-isogenic lines), ou encore IRBB (International Rice Bacterial Blight), à partir du parent récurrent IR24. Ces lignées, contenant chacune un gène de résistance (*Xa*) contre la maladie, ont été adoptées par différents auteurs pour caractériser plusieurs dizaines de races en Asie et trois en Afrique, dont les races A1 au Cameroun, Niger et Burkina Faso; A2 au Burkina Faso et A3 au Mali (Gonzalez et al. 2007). Une race représente l'ensemble des isolats ayant le même profil de virulence sur un panel de 12 lignées IRBB dont le parent IR24. La caractérisation des races de *Xoo* au Mali date de 2007 et avait été réalisée sur un échantillon de souches de *Xoo* de petite taille. C'est ce qui a justifié le

fait de conduire de nouvelles prospections dans les zones rizicoles afin de suivre l'évolution des races de *Xoo* et de décrire les nouvelles souches isolées au Mali. La caractérisation des races des souches nouvellement isolées est indispensable pour pouvoir développer des gènes de résistance (*Xa*) efficaces contre la maladie. Les NILs/IRBBs ont été développées à partir de sources de résistance identifiées en Asie contre les souches de *Xoo*. La probabilité pour que ces sources de résistance contrôlent durablement la population malienne de *Xoo* n'est pas connue. C'est pourquoi nous avons également procédé au criblage de lignées de riz cultivées au Mali pour leur résistance/sensibilité à la bactériose foliaire, ce qui pourrait faciliter la caractérisation de nouvelles sources de résistance contre la maladie.

## 2. Matériels et méthodes

Pendant 3 ans, nous avons mené des prospections dans les principaux centres de riziculture au Mali pour évaluer la présence de la maladie (flétrissement bactérien causé par *Xoo*) et la diversité des souches de *Xoo*. Nous avons pu ainsi compléter la collection de souches de *Xoo* établie par Gonzalez et al. en (2007) puis par V. Verdier en 2009. Les souches de *Xoo* isolées en 1979 et 2003 ont été utilisées comme référence. Les bactéries ont été isolées sur milieu PSA puis identifiées par la PCR multiplexe spécifique de *X. oryzae* développée par Lang et al. (2010). Le pouvoir pathogène des isolats a été testé sur la lignée de riz sensible Azucena. Les races ont été évaluées sur une série de 12 lignées de riz IRBBs portant chacune un gène de résistance unique. 29 lignées de riz cultivé au Mali ont été évaluées pour leur résistance aux différentes races de *Xoo*. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel R. Le logiciel GenSat, 12<sup>ème</sup> édition, a été également utilisé pour des analyses de comparaison des moyennes comme le test de Bonferroni.

## 3. Résultats et discussion

Une collection de 41 isolats de *Xoo* a été obtenue suite aux prospections réalisées à Sélingué et dans l'Office du Niger (ON). Aucun symptôme de la maladie n'a été observé à Baguineda pendant la période de 2010 à 2013. Les 41 souches isolées sont toutes virulentes sur la lignée sensible Azucena et se regroupent en six nouvelles races (de A4 à A9), établies selon leur profil de virulence sur les lignées IRBBs testées. La présence de la race A3, avirulente sur toutes les IRBB testées, confirme les résultats de Gonzalez et al. (2007). L'ensemble des sept races coexistent dans l'office du Niger dont deux sont majoritairement présentes (races A5 et A6). Ces deux races sont également présentes dans les rizières de Sélingué. La race A9 est la plus virulente, elle contourne tous les gènes de résistance *Xa* testés. La dissémination des souches de cette race représente un risque majeur pour la riziculture au Mali et le contrôle de ces souches est un vrai défi. Notre étude révèle également que les gènes de résistance les plus

efficaces sont *Xa1*, *Xa3*, et *Xa4*, et pourraient être utilisées pour lutter contre la maladie. Le criblage des variétés cultivées a permis de mettre en évidence deux variétés de riz très résistantes aux souches de *Xoo*, Giganté et SK20-28. Ces deux variétés possèdent une source de résistance à large spectre contre l'ensemble des races décrites et tous les isolats testés. Notre étude a également permis de caractériser huit pathotypes de *Xoo*, nommés de P1 à P8, au sein de la collection de *Xoo* et selon le profil de virulence des souches sur les variétés les plus résistantes. La faible association entre les races et les pathotypes de *Xoo* suggère que les allèles R qui gouvernent la résistance de Giganté et SK20-28 pourraient être probablement différents des gènes *Xa* connus et testés au travers des IRBB. Cette source de résistance est également différente de celle conférée à Giganté par le gène RYMV1 contre la panachure jaune du riz.

En conclusion, l'analyse de la virulence des souches de *Xoo* sur les lignées IRBBs et sur les variétés de riz cultivées au Mali fournit des informations importantes pour la mise en place de programmes de sélection efficace pour la résistance variétale contre le flétrissement bactérien du riz au Mali.

#### 4. Perspectives:

Au cours de cette étude, nous avons apporté de nouvelles connaissances sur les races de *Xoo* au Mali. Ces données seront exploitées dans la suite de ce travail et pour avancer sur la caractérisation des gènes gouvernant la résistance de Giganté et SK20-28 contre le flétrissement bactérien au Mali. Le transfert de cette résistance dans les variétés élites déjà adoptées par les paysans producteurs devrait permettre d'améliorer la productivité du riz au Mali. La surveillance épidémiologique de la maladie dans le temps devrait apporter des informations supplémentaires sur l'évolution de la structure des races de *Xoo* qui permettront de développer des méthodes de lutte adéquates.

## Characterization of new races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Mali informs Resistance gene deployment

Tekete, C<sup>1</sup>., Cunnac, S<sup>2</sup>., Doucouré, H<sup>1</sup>., Dembele, M<sup>3</sup>., Keita, I<sup>1</sup>., Sarra, S<sup>3</sup>., Karim, D<sup>3</sup>., Koita, O<sup>1</sup>., Verdier, V<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>University of Sciences, Techniques and Technologies of Bamako (USTT-B), Faculty of Science and Technology (FST), Applied Molecular Biology Lab (LBMA), Bamako, Mali

<sup>2</sup>IRD, CIRAD, Univ. Montpellier, IPME, Montpellier, France

<sup>3</sup>Institute of Rural Economy (IER), Regional Center for Agronomic Research (CRRA), Niono and Bamako, Mali

### Abstract

Bacterial leaf Blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* represents a severe threat to rice cultivation in Mali. Characterizing the pathotypic diversity of bacterial populations is key to the management of pathogen-resistant varieties. Forty-one *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates were collected between 2010 and 2013 in the major rice growing regions in Mali. All of them were virulent on the susceptible rice variety Azucena, and their evaluation on twelve near-isogenic rice lines, each carrying a single resistance gene, identified six new races (A4 to A9) and confirmed race A3 that was previously reported in Mali. Races A5 and A6, isolated in Office du Niger and Selingue are the most prevalent ones in Mali. Race A9 is the most virulent, circumventing all the resistance genes tested. Xa3 controlled six out of seven races, i.e. 89% of the isolates tested. The expansion of race A9 represents a major risk to rice cultivation and the urgent need to identify local source of resistance. We selected fourteen isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* representative of the most prevalent races to evaluate twenty-nine rice varieties grown by farmers in Mali. Six of them showed a high level of resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and were then screened with a larger collection of isolates. Based on the interactions among the six varieties and the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates we characterized eight different pathotypes (P1 to P8). Two rice varieties, SK20-28 and Gigante effectively control all the isolates tested. The low association observed among races and pathotypes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests that the resistance observed in the local rice varieties does not simply rely on single known *Xa* genes. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is pathogenically and geographically diverse. Both the races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* characterized in this study and the identification of sources of resistance in local rice varieties provide useful information to inform the design of effective breeding programs for resistance to bacterial leaf blight in Mali.

**Keywords:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, bacterial leaf blight, pathotype, race, resistance, rice, Mali.

### Introduction:

More than half of the world's population relies on rice as a staple source of nourishment (Sahu et al. 2018). Rice occupies a very important place in agriculture and for food security in Mali. Because of the extensive deployment of nitrogen-responsive modern rice varieties, bacterial

leaf blight (BLB) caused by the vascular pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), has become a major rice disease in the last decade worldwide (Busungu et al. 2018; Tilman et al. 2017; Khoshkdaman et al. 2012). In Mali, the disease was first reported in the late 1980s and thereafter in various African countries (EPPO 2017; Buddenhagen et al. 1979). Since 2002, plant health monitoring has reported increasing epidemics of the disease in Mali (Sarra et al. 2010). Variations in yield losses depend on the rice growing stage, the geographical location and the seasonal conditions (Ou 1985). Annual yield losses can vary between 50 and 80% in case of severe infections (Mishra et al. 2013; Verdier et al. 2012). Wounds and hydathodes are the main entry sites for *Xoo* where it multiplies in the epitheme, and subsequently enters into the xylem vessels where it starts active multiplication, leading to leaf wilting (Sahu et al. 2018; Ray et al. 2000).

To cause disease in rice, *Xoo* injects Transcription Activator-Like Effectors (TALE) virulence proteins into the host cell through the molecular syringe of the Type III Secretion System in order to upregulate the expression of target nuclear genes similar to eukaryotic transcription factors (Moore et al. 2014; Boch et al. 2010). TALE repertoire inventories based on genomic sequences revealed that individual African strains of *Xoo* contain nine TAL effectors that are classified in nine groups (Tran et al. 2018; Doucouré et al. 2018). The involvement of three of them (TalB, TalC and TalF) in the virulence of *Xoo* strains has been described (Tran et al. 2018; Yu et al. 2011). However, no clear relationship between TALE contribution to virulence and their evolutionary conservation has yet been observed in the *Oryza sativa* - *Xoo* pathosystem (Tran et al. 2018).

An understanding of the genetic and pathogenic diversity of the pathogen population is an absolute prerequisite for developing efficient breeding strategies adapted to local rice cultivation systems. Extensive studies on *Xoo* have been conducted in different rice producing countries such as China, India, Bangladesh, Japan, Nepal, Korea, Philippines and Mali (Doucouré et al. 2018; Chen et al. 2012; Li et al. 2009; Ochiai et al. 2000; Adhikari et al. 1999). Populations of *Xoo* are variable (Gautam et al. 2015; Khaeruni et al. 2013) with a high degree of genetic and pathotypic diversity as reported in the major rice-growing countries of Asia (Islam et al. 2016; Ochiai et al. 2000; Adhikari et al. 1995).

To control BLB, cultural, chemical and biological control approaches have been developed, but none of them has been found to be fully effective in the case of severe disease outbreaks (Islam et al. 2016; Mundt 2014). The selection of disease-resistant rice varieties has been found to be the most effective, economical and least environmentally damaging method for BLB control (Verdier et al. 2012; Mew 1987). Varietal resistance is thus considered a top-priority approach for controlling BLB in Mali, although in some cases major resistance genes are not durable because of the high degree of variation of the pathogen population (Cruz et al. 2000). Unintentionally, breeding programs can also alter pathogen population structure by favoring the emergence of underrepresented virulent clones (McDonald et al. 2002). Thus, before any breeding program for varietal resistance, the genetic and pathotypic diversity of

the pathogen must be studied in detail. Nowadays, different rice genes conferring resistance to *Xoo* have been identified and designated in a series of *Xa1* to *Xa44* (Vikal *et al.* 2017; Busungu *et al.* 2018, 2016). Major resistance genes have been incorporated into rice to develop BLB-resistant varieties and to construct Near Isogenic Lines (NILs) (Kim *et al.* 2011; Ogawa *et al.* 1991). These NILs and the recurrent parent IR24 are commonly used to characterize the race structure of the pathogen (Triplett *et al.* 2014). A *Xoo* race is a group of strains sharing the same virulence profile on a panel of twelve rice NILS. Several dozen of *Xoo* races have been reported in Asia, and new ones, virulent on the deployed breeding materials, are constantly emerging (Triplett *et al.* 2014; Liu *et al.* 2007). In West-Africa, three races have been identified with race A3 reported in Mali, race A1 and A2 in Burkina Faso, and A1 also reported in Niger (Gonzalez *et al.* 2007).

The efficiency and sustainability of the available resistance genes for BLB control in West Africa and in Mali in particular are poorly characterized. The present study primarily aimed at expanding our knowledge on the presence of *Xoo* surveying fields in the main rice growing centers in Mali and the race structure of *Xoo* isolates using a rice panel of NILs deployed by IRRI (International Rice Research Institute, Philippines). We also evaluate the known resistant genes available to control BLB and the resistance of cultivated rice varieties to *Xoo* in Mali.

## **Materials and methods:**

### **Surveys and isolation of *X. oryzae pv. oryzae***

Simple random sampling was used to collect rice leaves with BLB symptoms between 2010 and 2013 in three rice production centers in Mali: the Office du Niger, Baguinéda and Sélingué regions (Figure 1). Samples were tagged to record date of collection, host plant, site, GPS data, and stored at -20° C in the lab prior processing. A total of 60 samples were analyzed. Bacteria were isolated from infected leaves adapting the method described by Adhikari *et al.* (1994). After a brief surface disinfection of the infected tissue, a 5 cm fragment of the leaf sample was macerated with a homogenizer in a plastic bag (Bioreba) containing sterilized water. The macerate was incubated at 4 ° C for 30 minutes to 1 hour, diluted in series of 1/10, 1/100 and 1/1000 and spread on a semi-selective medium of PSA (peptone 10 g/l, sucrose 10 g/l, glutamic acid 1 g/l, bacto agar 16 g/l, actidione 50 mg/l, cephalixin 40 mg/l and 20 mg/l kasugamycin). Cultures were incubated for up to 3 days at 28° C. Simple colonies, pale yellow, were isolated and purified twice on PSA medium. A single purified bacterial colony was then selected per sample. A nomenclature was adopted in 2003 (Gonzalez *et al.* 2007) for the codification of *Xoo* isolates in Mali. The MAI term for Mali IRD followed by number as an index ranging from 1 to n was assigned to each isolate. Four reference strains of *Xoo* originated from Mali (Gonzalez *et al.* 2007) were used as controls. Colony-multiplex PCR was used to confirm that each isolate belonged to the *Xanthomonas oryzae* species and *oryzae* pathovar (Lang *et al.* 2010). The amplification was carried out using a thermocycler MJ Research PTC-200 according to the conditions described by Lang *et al.* (2010). Visualization of the PCR product

after electrophoresis on a 1.5% agarose gel was done using a Kodak device with EDAS™ software.

### **Pathogenicity assays**

The pathogenicity of the *Xoo* isolates was evaluated on the susceptible variety Azucena. Characterization of the *Xoo* isolates into virulence groups (races) was conducted on a set of twelve NILs each carrying a specific resistance (R) gene and the recurrent parent IR24 using a simplified scale developed by IRRI (Quibod et al. 2016). Seeds were obtained from IRRI. As part of our objective to search for a broad-spectrum source of resistance against *Xoo* isolates, we evaluated the resistance of twenty-nine rice varieties grown in Mali (Supplemental Table 1). The seeds were obtained from the breeding program at the Institute of Rural Economy (IER, Mali).

The pathogenicity assays were carried out in pots under the agro-ecological conditions of the agricultural experiment station of IER Sotuba in 2014 and 2015. Two-week-old plants were transplanted into 10-kg pots filled with natural potting soil following the experimental split plot designs with three replicates. Potting soil used results from the natural decomposition of the organic matter of the virgin forest of the station. The experiments were carried out during wintering (rainy season) periods in order to benefit from the effect of the high content of the relative humidity whose mean value was 74% for a maximum of 88% and a minimum of 61% and a mean temperature of 28.05°C, ie, 22.96°C minimum and 33.15°C maximum. About 3 g of DAP fertilizer (Diammonium Phosphate: 18-46-0) was used 3 times per pot on the 15th, 25th and 35th days after sowing. Strain MA11 (Gonzalez et al. 2007) was used as control and sterilized distilled water as a negative control for leaf inoculations in all the assays. The inoculum was prepared with sterilized distilled water and bacterial colonies from a 24-hour culture on PSA medium at 28 ° C. The bacterial suspensions were adjusted at an optical density (OD 600) of 0.2 ( $10^8$  CFU/mL) using the spectrophotometer Biophotometer 6131 (Eppendorf, Germany). The 45-day plants were inoculated by leaf clipping following the procedure proposed by Kauffman et al. (1973). A total of 6 plants, i.e. 12 leaves per rice line, were inoculated with each isolate. After inoculation, a layer of water 5 cm thick was maintained under the plants to maximize relative humidity. Observations were done 15 days after inoculation. The measurement of lesion lengths (LL) was done in centimeter (cm) using a graduated ruler. Disease reactions were classified as follow: interactions with average lesion length  $\leq$  5 cm were classified as resistant (R) and as susceptible (S) when superior ( $>$ ) to 5 cm (Quibod et al. 2016; Adhikari et al. 1999).

### **Statistical analysis:**

The means lesion length (LL) associated to each isolate were used to study the responses of rice lines to the disease. Isolates were grouped into races or into pathotypes when presenting the same virulence profile on NILs or on the six Malian varieties respectively. To do this, a data matrix associated with the virulence of isolates was generated by noting avirulence "0" when

$LL \leq 5$  and virulence "1" when  $LL > 5$ . Lesion length data for each rice line- isolate combination was subjected to two-factor analysis of variance (ANOVA) following the Fisher's Least Significant Difference (LSD). LSD significance level was estimated at 5%. Comparative analyzes of lesion means were done using Bonferroni test under GenStat software. This data was analyzed with the R statistical software to perform Hierarchical Clustering (HC). Hierarchical Clustering on Principal Components (HCPC) was conducted using the FactoMineR package (Cornillon et al. 2012). Distance chosen is the Euclidean distance and the aggregation method, that of Ward. Races (Virulence profile) have been described with variables using the desc function. The ComplexHeatmap package was used to build and visualize the various heatmaps generated in this study.

## Results

### Isolation and Identification of *Xoo* in Mali

Field surveys were conducted during the rainy season in three major rice-growing areas in Mali (Baguineda, Office du Niger and Sélingué). Symptoms of BLB were observed in almost all visited areas except in Baguineda where the disease was not reported so far. Between 2010 and 2013, 60 rice leaf samples showing BLB symptoms were collected (Figure 1). One leaf per sample was processed for bacterial isolation. In total, forty-one *Xoo* isolates forming pale yellow colonies on PSA medium, were isolated and confirmed by multiplex PCR (Table 1). We isolated *Xoo* from many pilot rice varieties grown in Mali and from wild species, *O. longistaminata* and *O. barthii* (Table 1).

To confirm their pathogenicity all the isolates were tested on the susceptible rice variety Azucena using a leaf-clipping assay. Typical symptoms of BLB were visible for all the isolates 15 days after inoculation. Lesion lengths caused by the isolates varied from 6 to 50 cm (Figure 2). Many of them caused complete leaf blight 3 to 4 weeks after inoculation, and plant death after two months. One-way analysis of variance on lesion length revealed that there is a significant difference among isolates ( $p < 0.001$ ). Overall, the symptoms were comparable to those observed with the *Xoo* reference strains. Altogether, our data (PCR and pathogenicity test) confirmed the 41 Malian isolates as *Xoo* (Table 1).

### Evaluation of the near isogenic lines carrying R genes

To evaluate the effectiveness of available *Xa* resistance genes, 45 *Xoo* isolates were inoculated on 12 NILs (also named IRBB lines), each containing a single BLB R genes. The IRBB lines showed differential reactions against the 45 *Xoo* isolates (Figure 3 A, B, C). Lesion length varied from 0 up to 35 cm (Figure 3 B). Bonferroni test, according to which the averages bearing the same letter are not significantly different, confirmed that IRBB lines show different levels of resistance (Figure 3 B). Similarly, a significant difference is observed among the IRBBs and between the IRBBs and the isolates tested ( $p < 0.001$ ). IR24, the recurrent parent of the near-isogenic lines, is susceptible to 40 out of 45 isolates tested. Most NILs were susceptible to the majority of the isolates (Figure 3 A, B, C). The hierarchical clustering analysis showed four

clusters with IRBB1 and IRBB3 forming one with high resistance to *Xoo* in Mali (Figure 3 A and Table 2). The four most susceptible NILs formed another cluster. The two other clusters consisted of the most differentials NILs (Figure 3 A). None of the IRBB lines showed complete resistance to all the *Xoo* isolates (Figure 3 B, C and Table 2). .

### Identification of new Malian *Xoo* races

The same dataset was analyzed for the identification of races of *Xoo* based on the interactions among isolates and NILs. Forty-five *Xoo* were classified into seven races, named A3 to A9, following a categorical analysis of the lesion length associated with each combination of NIL and *Xoo* isolates (Figure 3 A and Table 2). The proportion of different races among the isolates varies from 4% (race A7) to 29% (race A6) (Table 2). Using an additional NIL carrying *Xa23*, A6 and A5 subdivide into two distinct races respectively (Table 2). Race A3 is avirulent on all NILs and the recurrent parent IR24. Importantly, strains belonging to race A9 are virulent on all the IRBB lines including IRBB23 (*Xa23*). None of the resistance genes tested can effectively control all the different races of *Xoo* (Table 2). The most effective R gene, *Xa3*, controls 6 out of the 7 races. *Xa1* and *Xa4* each control 4 out of the 7 races. The recessive *xa5* gene controls A4 race (Table 2).

The races are described according to the variables that characterize them (Supplemental Table 2). Races A4 and A5 show a virulence significantly lower than the overall mean. Race A5 also shows a significantly higher virulence on IRBB5 and race A7 is significantly less virulent on IRBB1.

To obtain a quantitative representation of the virulence of the isolates belonging to the different races, we plotted side by side the virulence profiles with the race classification of Malian *Xoo* isolates (Figure 3 A). Except for race A3, it appears that there is a low correlation between virulence profile and race classification.

The geographical distribution of the different races of *Xoo* in Mali is shown in Table 3. Isolates from Office du Niger are the most diverse with all the races present in this region (Table 3). Two predominant races, A5 and A6, are also reported in Selingue (Table 3).

### Screening local rice varieties for resistance to BLB

Considering that none of the R genes present in the NILs tested was able to control the different races of *Xoo* reported in Mali, we next aimed at identifying sources of broad resistance against *Xoo* in a panel of twenty-nine local rice varieties (Figure 4). These varieties were first screened with fourteen isolates representative of the most prevalent races (Figure 4 A).

Our data show a significant difference in virulence among the fourteen isolates ( $p < 0,001$ ) (Figure 4 and supplemental Figure 1). Different responses were also observed among the varieties (Figure 4A, B and C). Overall lesion length data by variety reveal large lesion length

variations ranging from 0 to 45 cm (Figure 4 B). Thirteen varieties are susceptible to all the *Xoo* isolates tested (Figure 4C). Three (Gigante, Kogoni 91-1 and SK-20-28) are resistant to all fourteen isolates (Figure 4A and 4C). Thirteen other varieties show different reactions (resistant or susceptible) to *Xoo* (Figure 4 A and 4C). Among these, three (SK-19-34, SK-95-4, WAS-203-B) control at least 50% of the isolates (Figure 4 C).

Overall lesion length data by isolate highlight their virulence diversity on the panel of rice varieties tested with the exception of three isolates that present the same virulence (Supplemental Figure 1). The hierarchical clustering dendrogram of this dataset containing the fourteen isolates was arbitrarily cut into 4 clusters (C1 to C4) (Figure 4 A). *Xoo* MAI100 and MAI105 belonging to cluster (C1) are incompatible on the variety Gambiaka Kokoum. Similarly, *Xoo* belonging to cluster C4 are weakly virulent on SK-7-8. Two varieties, Giganté and SK20-28 control all the isolates.

Figure 4 A shows the low association among virulence clusters and *Xoo* races. Hierarchical clustering tree of rice varieties based on lesion length data was arbitrarily cut into 4 clusters (R1 to R4) (Figure 4 A). The R2 cluster represents the most susceptible varieties (Gambiaka Kokoum and DM16). Rice variety SK-7-8 forms alone cluster R3, and effectively controls 5 out of 14 isolates. Cluster R4 encompass 12 varieties mainly susceptible to *Xoo* isolates. The R1 cluster consists of 3 subgroups, with one encompassing six varieties with a high level of resistance to *Xoo*.

These six resistant varieties were subsequently tested with a larger number of *Xoo* isolates (Figure 5 A, 5B and 5C). A two-way analysis of variance showed a significant difference among the isolates ( $p < 0.001$ ). A significant difference ( $p < 0.001$ ) is also observed between varieties and in the interaction between varieties and isolates. Bonferroni test confirms these results. Gigante and SK-20-28 displayed a broad spectrum of resistance (LL = 0), against the seven races reported in Mali (Figure 5B and 5C and Table 4). The response of both varieties to *Xoo* infection was characterized by a rapid necrosis reminiscent of a hypersensitive response. Four varieties, showed a high level of resistance by controlling respectively 56% to 91% of the *Xoo* isolates in this extended panel.

### Identification of *Xoo* pathotypes

Lesion lengths data aggregated by isolate and variety (45 isolates X 6 varieties) are displayed in the heatmap presented in Figure 5A. A clustering analysis was performed on lesion lengths coded as 'resistant' (average lesion length  $\leq 5$ cm) or 'susceptible' (average lesion length  $> 5$ cm) revealing the existence of eight virulence clusters called pathotypes, noted from P1 to P8 (Figure 5 A, Table 1 and supplemental Table 1). The pathotype P1 is the most abundant (including 20 out of 45 isolates) and controlled by the six varieties tested (Figure 5A). The other seven pathotypes (P2 to P8) regroup 25 out of 45 isolates and were each virulent on one, two or three varieties (Figure 5A). Gigante and SK-20-28 are highly resistant to all races and

pathotypes of *Xoo* (Figure 5 A and Table 4). Figure 5A illustrates the low level of association among races and pathotypes.

## Discussion

Isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* were collected from rice in different regions in Mali and characterized. Our study revealed the existence of seven races among forty-one *Xoo* isolates. While Xa1 and Xa3 are the most effective R genes to control *Xoo* in Mali no single resistance gene is effective to the different races. A new race (A9) is overcoming all the known resistance genes tested. Two varieties grown in Mali, SK20-28 and Gigante, are broadly resistant to the Malian *Xoo* strains.

### Virulence of *Xoo* is not related to the host plant

Bacteria were predominantly isolated from the rice variety Adny. This high yielding variety is the most cultivated one in Mali and highly susceptible to the disease. We did not detect any distinct virulence pattern among *Xoo* isolates collected from cultivated varieties or from wild rice (*O. barthii* and *O. longistaminata*). Similar results have been observed on *Xoo* population in Asia (Adhikari et al. 1999; Ardales 1996), suggesting that the genetic background of the rice varieties does not significantly affect the virulence of *Xoo* strains.

### Six new races of *Xoo* have been characterized with Xa3 being the most efficient R gene.

Based on their reaction on twelve IRBB lines including IR24, seven races of *Xoo* were identified among the isolates collected between 2010 and 2013 in Mali. Race A3 was previously described in two distinct regions in Mali, Kayes and Office du Niger (Gonzalez et al. 2007). Our study confirmed its presence in Office du Niger. Race A3 is totally incompatible with the NILs and its founder IR24 carrying the resistance gene *Xa18* (Noda et al. 1996). Race A3 might carry an *avr* gene in their genome that would be specifically recognized by *Xa18* and therefore by all the derivatives NIL (Gonzalez et al. 2007). Absence of race A3 in Asia may be due to the fact that IR24, the founder of the NILs (IRBB lines), was selected based on its susceptibility to all *Xoo* isolates in Japan and in the Philippines (Ogawa 1993). Races A1 and A2, previously described in Africa (Gonzalez et al. 2007), were not found in this study. Also, ten *Xoo* races were described in the Philippine during a 40-year collection period (Quibod et al. 2016, Triplett et al. 2014) and none of these were characterized in Mali. The burst of *Xoo* races in Mali, from the single race A3 to six new races in less than thirty years, could be explained by a bias due to the very limited number of previously collected and characterized *Xoo* strains (Gonzalez et al. 2007). However, the bacterial races tend to evolve continually, influenced by the artificial and natural selection of BLB resistant genes in rice (Vikal et al. 2017). The emergence of novel pathogen populations is a common phenomenon in the agricultural landscape that can be associated with events of selection (Burdon et al. 2008). In the Philippines, a major race shift has been observed associated with the introduction of a resistant gene (*Xa4*) in rice (Quibod et al. 2016, Mew et al. 1992). A gene transfer event or a single mutation could also provoke the emergence of new *Xoo* races (Ochiai et al. 2005). However, in Mali, no known R gene is yet

deployed for the control of BLB disease and we do not yet know which resistant genes are present in the Malian varieties. It is therefore difficult to draw any conclusions yet on the evolution of races in Mali in relation to the presence of R gene in cultivated or wild rice.

Race A9 collected on cultivated and wild rice species in three locations of Office du Niger is the most virulent as it circumvents all the *Xa* genes tested. The dissemination of A9 represents a major risk for rice production in Mali. The ability of *Xoo* strains to overcome all *Xa* genes has been reported in different countries by several authors (India, Nepal, Sri-Lanka) arguing for the need to identify new sources of resistance against the disease in targeted areas (Mishra et al. 2013; Adhikari et al. 1999, Triplett et al. 2014). It is also a major challenge for the control of BLB in Mali.

The geographical location of the *Xoo* races in Mali shows that Office du Niger has seven and Selingue two. Rice cultivation at Office du Niger have begun decades before Selingue and recently intensified. From our discussions with local rice producers during sample collection, the disease appeared with rice cultivation in Selingue. It is possible that the two predominant races present in Office du Niger (A5 and A6) were disseminated to other regions probably through seed or plant exchanges.

The characterization of races of *Xoo* in Mali will inform breeders on the use and development of effective resistance genes in rice varieties (Khoshkdaman et al. 2012; Jeung et al. 2006). *Xa3* and *Xa1* are potentially the most effective R genes to control the different races described in Mali while they are not effective to control *Xoo* population in the Philippines or in Sri Lanka (Triplett et al. 2014). In Japan, *Xa1* confers a highly specific resistance to race 1 that is widespread in rice fields over the country. In Mali, Selingue and Office du Niger represent two distinct agroecological regions with irrigated rice system. Farmers often are supplied with the same seed distributors and in practice, there is no measure to prevent seed or seedling exchanges between them. Thus, although *Xa1* and *Xa3* each control the two races reported in Selingue, the deployment of specific R genes in one or the other region without taking into account the global structure of the *Xoo* population (races) in Mali is not recommended. However, pyramiding R genes in a cultivated elite rice line could be an effective solution to control BLB in Mali. Indeed, several authors have reported that the combination of *Xa* genes results in synergistic effect on the resistance spectrum of rice to BLB (Mishra et al. 2013; Khoshkdaman et al. 2012). Combinations of *Xa1*, *Xa3* and *Xa4* genes in elite lines could bring significant results to control BLB in relevant areas of rice production in Mali. Bacterial blight (BB) resistance gene, *Xa23* has been identified from *Oryza rufipogon* (Wang et al. 2015). Its transcription is specifically activated by the TAL effector *AvrXa23* (Zhou et al. 2011). *Xa23* will not be effective alone but could be used in combination to *Xa1*, *Xa3* to control most of the races characterized in Mali so far.

**Varieties SK20-28 and Gigante display a broad resistance against *Xoo*.**

Most of the rice varieties widely cultivated by farmers in Mali are susceptible to *Xoo*, albeit to variable levels. Six of them are highly resistant, with SK20-28 and Gigante the most promising ones. SK20-28 was selected from the Gigante parent as part of the national research program against the Rice Yellow Mottle Virus in Mali. Rice Yellow Mottle Virus 1 (RYMV1) has been identified and characterized in Gigante (Oludare et al. 2016; Albar et al. 2003). SK20-28 does not carry RYMV1, suggesting that resistance to BLB is independent of the RYMV1 gene. Possibly SK20-28 and Gigante may carry new resistance gene(s) against BLB or a natural variation of known *Xa* genes that confer a broad spectrum of resistance against the Malian *Xoo* population. Characterization of gene(s) responsible for SK20-28 and Gigante resistance needs to be further investigate.

In conclusion, the *Xoo* population is divided into 7 races and 8 pathotypes and is geographically diverse. These informations should inform breeders on R genes to be deployed in Mali. Pyramiding R genes should be an effective solution to control the different races characterize so far in Mali. In addition, two rice varieties displaying a broad-spectrum resistance to *Xoo* population were identified. Further characterization, use and transfer of this resistance in high yielding varieties should significantly improve rice productivity and BLB control in Mali.

#### **Acknowledgements:**

We thank the International Foundation for Science for support of C.T., O.K and K.D (IFS contract C/5650-1). We thank IRD for the BEST scholarship to C.T. and for support to the Jeune Equipe Associée to IRD (JEA Coana). We thank the French Embassy in Mali for the SCAC scholarship to C.T. We thank the Training of Trainers Program (PFF) of the University of Science, Techniques and technologies of Bamako (USTTB) for support of C.T. The authors declare no conflict of interest.

#### **Author contributions:**

CT., O.K. and V.V. designed the research; C.T., K.D., M.D., S.S., I.K., H.D., O.K. and V.V. performed the research; C.T., S.C., V.V analysed the data; C.T., O.K., S.C. and V.V wrote the manuscript.

#### **References:**

- Adhikari, T. B., T. W. Mew, and J. E. Leach. 1999. "Genotypic and Pathotypic Diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal." *Phytopathology* 89 (8): 687–94. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.8.687>.
- Adhikari, T. B., C. M. Vera Cruz, Q. Zhang, R. J. Nelson, D. Z. Skinner, T. W. Mew, and J. E. Leach. 1995. "Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia." *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 6.
- Adhikari, T. B., T. W. Mew, and P. S. Teng. 1994. "Phenotypic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal." *Plant Disease (USA)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9434820>.
- Albar, L., M.-N. Ndjioudjop, Z. Esshak, A. Berger, A. Pinel, M. Jones, D. Fargette, and A. Ghesquière. 2003. "Fine Genetic Mapping of a Gene Required for Rice Yellow Mottle Virus Cell-to-Cell

- Movement." *TAG Theoretical and Applied Genetics* 107 (2): 371–78. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1258-4>.
- Ardales, E. Y., H. Leung, C. M. Vera Cruz, T. W. Mew, J. E. Leach, and R. J. Nelson. 1996. "Hierarchical Analysis of Spatial Variation of the Rice Bacterial Blight Pathogen Across Diverse Agroecosystems in the Philippines." *Phytopathology* 86 (3): 241. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-241>.
- Boch, Jens, and Ulla Bonas. 2010. "Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function." *Annual Review of Phytopathology* 48: 419–36. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>.
- Buddenhagen, I. W., H. H. Vuong, and D. D. Ba. 1979. "Bacterial Blight Found in Africa." *International Rice Research Newsletter* 4 (1). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801367355>.
- Burdon, J J, and P H Thrall. 2008. "Pathogen Evolution across the Agro-Ecological Interface: Implications for Disease Management." *Evolutionary Applications* 1 (1): 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00005.x>.
- Busungu, C, S Taura, J I Sakagami, T Anai, and K Ichitani. 2018. "High-Resolution Mapping and Characterization of *Xa42*, a Resistance Gene against Multiple *Xanthomonas oryzae* Pv. *Oryzae* Races in Rice (*Oryza Sativa* L.)." *Breeding Science* 68 (2): 188–99. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.17094>.
- Busungu, C, S Taura, J I Sakagami, and K Ichitani. 2016. "Identification and Linkage Analysis of a New Rice Bacterial Blight Resistance Gene from XM14, a Mutant Line from IR24." *Breeding Science* 66 (4): 636–45. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16062>.
- Chen, X L., L Yu, L L. Gao, T Jiang, Q Y. Li, and Q Huang. 2012. "Elevational Variation in Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in South-West China: Diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *Journal of Phytopathology* 160 (6): 261–68. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01892.x>.
- Cornillon, P-A, F Husson, N Jégou, E Matzner-Lober, J Josse, Arnaud Guyader, Laurent Rouvière, and Maela Kloareg. 2012. *Statistiques avec R*. 3e édition revue et augmentée. Pratique de la statistique. Presses universitaires de Rennes.
- Doucouré, H, A. L. Pérez-Quintero, G Reshetnyak, C Tekete, F Auguy, E Thomas, R Koebnik, et al. 2018. "Functional and Genome Sequence-Driven Characterization of Tal Effector Gene Repertoires Reveals Novel Variants with Altered Specificities in Closely Related Malian *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Strains." *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01657>.
- EPPO. 2017. "European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)." 2017. <https://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.
- Gautam, R K., P K. Singh, K Sakthivel, M Srikumar, N Kumar, K Kumar, A K. Singh, and S D Roy. 2015. "Analysis of Pathogenic Diversity of the Rice Bacterial Blight Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in the Andaman Islands and Identification of Effective Resistance Genes." *Journal of Phytopathology* 163 (6): 423–32. <https://doi.org/10.1111/jph.12338>.
- Gonzalez, C, B Szurek, C Manceau, T Mathieu, Y Séré, and V Verdier. 2007. "Molecular and Pathotypic Characterization of New *Xanthomonas oryzae* Strains from West Africa." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (5): 534–46. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0534>.
- Islam, Md R, Md S Alam, A I Khan, I Hossain, L R. Adam, and F Daayf. 2016. "Analyses of Genetic Diversity of Bacterial Blight Pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Using IS1112 in Bangladesh." *Comptes Rendus Biologies* 339 (9): 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.06.002>.
- Jeung, J. U., S. G. Heu, M. S. Shin, C. M. Vera Cruz, and K. K. Jena. 2006. "Dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Populations in Korea and Their Relationship to Known Bacterial Blight Resistance Genes." *Phytopathology* 96 (8): 867–75. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0867>.
- Kauffman, H. E., A. P. K. Reddy, S. P. Y. Hsieh, and S. D. Merca. 1973. "Improved Technique for Evaluating Resistance of Rice Varieties to *Xanthomonas oryzae*." *Plant Disease Reporter*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201303262926>.

- Khaeruni, A, and T Wijayanto. 2013. "Pathotype Grouping of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from south Sulawesi and Southeast Sulawesi." *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science* 35 (2): 138–44. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v35i2.256>.
- Khoshkdaman, M, A A Ebadi, and D Kahrizi. 2012. "Evaluation of Pathogenicity and Race Classification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Guilan Province-Iran." *Agricultural Sciences* 03 (July): 557. <https://doi.org/10.4236/as.2012.34066>.
- Kim, K. Y., M. S. Shin, W. J. Kim, H. S. Park, J. C. Ko, J. K. Nam, W. C. Shin, et al. 2011. "Development of Near-Isogenic Lines (NILs) Conferring Xa4, Xa5 and Xa21 Genes Resistant to Bacterial Blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) in Japonica Rice Genetic Background." *Korean Journal of Breeding Science*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid>
- Lang, J M., J P. Hamilton, M G Q. Diaz, M A Van Sluys, M. R G. Burgos, C M. Vera Cruz, C. R Buell, N A. Tisserat, and J E. Leach. 2010. "Genomics-Based Diagnostic Marker Development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*." *Plant Disease* 94 (3): 311–19. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0311>.
- Li, G, C F Song, X M Pang, Y Yang, and J S Wang. 2009. "Analysis of Pathotypic and Genotypic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in China." *Journal of Phytopathology* 157 (4): 208–18. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01471.x>.
- Liu, H., W. Yang, B. Hu, and F. Liu. 2007. "Virulence Analysis and Race Classification of *Xanthomonas oryzae* Pv. *Oryzae* in China." *Journal of Phytopathology* 155 (3): 129–35. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01197.x>.
- McDonald, B, A., and L Celeste. 2002. "Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance." *Annual Review of Phytopathology* 40 (1): 349–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>.
- Mew, T W. 1987. "Current Status and Future Prospects of Research on Bacterial Blight of Rice." *Annual Review of Phytopathology* 25 (1): 359–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.002043>.
- Mew, T. W., C. M. Vera Cruz, and E. S. Medalla. 1992. "Changes in Race Frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Response to Rice Cultivars Planted in the Philippines." *Plant Disease (USA)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9317148>.
- Mishra, D, M R Vishnupriya, M G Anil, K Konda, Y Raj, and R V. Sonti. 2013. "Pathotype and Genetic Diversity amongst Indian Isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *PLoS ONE* 8 (11): e81996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081996>.
- Moore, G, S Audrey, M Barker, L Bond, C Bonell, C Cooper, W Hardeman, et al. 2014. "Process Evaluation in Complex Public Health Intervention Studies: The Need for Guidance." *Journal of Epidemiology and Community Health* 68 (2): 101–2. <https://doi.org/10.1136/jech-2013-202869>.
- Mundt, C C. 2014. "Durable Resistance: A Key to Sustainable Management of Pathogens and Pests." *Infection, Genetics and Evolution* 27 (October): 446–55. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.011>.
- Noda, T, T Yamamoto, H Kaku, and O Horino. 1996. "Geographical Distribution of Pathogenic Races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Japan in 1991 and 1993." *Japanese Journal of Phytopathology* 62 (6): 549–53. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.62.549>.
- Ochiai, H., O. Horino, K. Miyajima, and H. Kaku. 2000. "Genetic Diversity of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Strains from Sri Lanka." *Phytopathology* 90 (4): 415–21. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.4.415>.
- Ochiai, H, I Yasuhiro, M Takeya, A Sasaki, and H Kaku. 2005. "Genome Sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity." *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 39 (4): 275–87. <https://doi.org/10.6090/jarq.39.275>.
- Ogawa, T, T Yamamoto, G. S. Khush, and T-W. Mew. 1991. "Breeding of Near-Isogenic Lines of Rice with Single Genes for Resistance to Bacterial Blight Pathogen (*Xanthomonas campestris* pv.

- oryzae*)." *Japanese Journal of Breeding* 41 (3): 523–29.  
<https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.41.523>.
- Ogawa, Tsugufumi. 1993. "Methods and Strategy for Monitoring Race Distribution and Identification of Resistance Genes to Bacterial Leaf Blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) in Rice [*Oryza Sativa*]." *JARQ (Japan)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP9403801>.
- Oludare, A, H T Tossou, K Kini, and D Silué. 2016. "Diversity of Rice Yellow Mottle Virus in Benin and Togo and Screening for Resistant Accessions." *Journal of Phytopathology* 164 (11–12): 924–35. <https://doi.org/10.1111/jph.12512>.
- Ou, S H. 1985. *Rice Diseases*. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, United Kingdom. IRRI.
- Quibod, I L, A Perez-Quintero, N J. Booher, G S. Dossa, G Grande, B Szurek, C Vera Cruz, A J. Bogdanove, and R Oliva. 2016. "Effector Diversification Contributes to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Phenotypic Adaptation in a Semi-Isolated Environment." *Scientific Reports* 6 (September). <https://doi.org/10.1038/srep34137>.
- Ray, S K., R. Rajeshwari, and R V. Sonti. 2000. "Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Deficient in General Secretory Pathway Are Virulence Deficient and Unable to Secrete Xylanase." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (4): 394–401.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.4.394>.
- Sahu, S K, P Zheng, and N Yao. 2018. "Niclosamide Blocks Rice Leaf Blight by Inhibiting Biofilm Formation of *Xanthomonas oryzae*." *Frontiers in Plant Science* 9 (March).  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00408>.
- Sarra, S, L Diarra, M Dembele, M M Coulibaly, and Y Séré. 2010. "Characterization of Bacterial Leaf Blight Epidemic in the Office Du Niger (Mali) and Search for a Sustainable Resistance against the Pathogen," July.
- Tilman, D, M Clark, D R. Williams, K Kimmel, S Polasky, and C Packer. 2017. "Future Threats to Biodiversity and Pathways to Their Prevention." *Nature* 546 (7656): 73–81.  
<https://doi.org/10.1038/nature22900>.
- Tran, Tuan T., Alvaro L. Pérez-Quintero, Issa Wonni, Sara C. D. Carpenter, Yanhua Yu, Li Wang, Jan E. Leach, et al. 2018. "Functional Analysis of African *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* TALomes Reveals a New Susceptibility Gene in Bacterial Leaf Blight of Rice." *PLOS Pathogens* 14 (6): e1007092. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007092>.
- Triplett, Lindsay, Ralf Koebnik, Valerie Verdier, and Jan E. Leach. 2014. "The Genomics of *Xanthomonas Oryzae*." In *Genomics of Plant-Associated Bacteria*, edited by Dennis C. Gross, Ann Lichens-Park, and Chittaranjan Kole, 127–50. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3_6).
- Vera Cruz, C M., J Bai, I Oña, H Leung, R J. Nelson, T-W Mew, and J E. Leach. 2000. "Predicting Durability of a Disease Resistance Gene Based on an Assessment of the Fitness Loss and Epidemiological Consequences of Avirulence Gene Mutation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (25): 13500–505. <https://doi.org/10.1073/pnas.250271997>.
- Verdier, V, C Vera Cruz, and J E. Leach. 2012. "Controlling Rice Bacterial Blight in Africa: Needs and Prospects." *Journal of Biotechnology*, Biotechnology for enhancing plant production and food quality - IBS 2010 Part III, 159 (4): 320–28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.020>.
- Vikal, Y, and D Bhatia. 2017. "Genetics and Genomics of Bacterial Blight Resistance in Rice." *Advances in International Rice Research*. <https://doi.org/10.5772/67361>.
- Wang, C, X Zhang, Y Fan, Y Gao, Q Zhu, C Zheng, T Qin, et al. 2015. "Xa23 Is an Executor R Protein and Confers Broad-Spectrum Disease Resistance in Rice." *Molecular Plant* 8 (2): 290–302.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.010>.
- Yu, Y, J Streubel, S Balzergue, A Champion, J Boch, R Koebnik, J Feng, V Verdier, and B Szurek. 2011. "Colonization of Rice Leaf Blades by an African Strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Depends on a New TAL Effector That Induces the Rice Nodulin-3 Os11N3 Gene." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24 (9): 1102–13. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-10-0254>.

Zhou, Yong-Li, Veronica N. E. Uzokwe, Cong-He Zhang, Li-Rui Cheng, Lei Wang, Kai Chen, Xiao-Qing Gao, et al. 2011. "Improvement of Bacterial Blight Resistance of Hybrid Rice in China Using the *Xa23* Gene Derived from Wild Rice (*Oryza Rufipogon*)." *Crop Protection* 30 (6): 637–44. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.12.002>.

**Figure 1. Map of Mali showing the different rice regions visited and the geographical distribution of *Xoo* races.** Diseased leaf samples were collected in the rice-growing perimeters of Niono (Office du Niger: ON) and Selingue and their location is represented as colored dots on the map. The race composition of *Xoo* populations in these perimeters is reported using shape symbols as described on the map.

**Figure 2. Virulence of forty-five isolates of *Xoo* on the rice variety Azucena.** Overall lesion length data by isolate. X-axis indicates the *Xoo* isolates tested. Y-axis indicates the lesion length in cm per isolate 14 days after inoculation using the leaf clipping method. The boxes inside are the box plots of the lesions lengths, the line on the inside indicates the median. Data from at least three independent replicate of the experiment with each 6 replicate lesion length values per treatment (Azucena x isolates combination) was used to generate the graph. The dots represent the lesion lengths that are out of whiskers.

**Figure 3. Efficiency of rice resistance genes (*Xa*) in IRBB lines to forty-five isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.** (A) Virulence profile clustering of *Xoo* isolates on a set of twelve IRBB lines. On the heatmap, each interaction (IRBB lines x *Xoo*), (i.e individual cell colors) code for the corresponding mean lesion length across three independent replicates of the experiment with each 6 values. Races are color-coded in the colored bar on the right. Isolates were also clustered according to their quantitative virulence profiles using a hierarchical clustering approach based on pairwise Euclidian distances as displayed in the tree on the left. The susceptibility profile of the NILs were also clustered using the same method as displayed on the hierarchical tree above the heatmap. (B) Overall lesion length data by IRBB line. X-axis indicates the IRBB lines. Y-axis indicates the lesions lengths in cm observed 14 days after inoculation by leaf clipping. The displayed data (box plots) corresponds to lesion lengths of three repetitions per treatment (combination IRBBs x isolates). Mean lesion lengths with the same letter (a to l) are not significantly different (Bonferroni test). (C) Relative frequency of resistance (R in blue) or susceptibility (S in pink) reactions against Malian isolates for individual IRBB lines derived from the dataset of panel B. Reactions with average lesion length  $\leq 5$  cm were considered resistant, and  $> 5$  cm were considered susceptible.

**Figure 4. BLB susceptibility profile of twenty-nine rice varieties cultivated in Mali. (A) Virulence profile of fourteen isolates on the rice varieties tested.** Heatmap display of the aggregated lesion length data by isolate and by variety. For each interaction (rice varieties x *Xoo* isolates), individual cell colors code for the corresponding mean lesion length across three independent replicates of the experiment with each six replicates. Races are color-coded in the colored bar on the right. *Xoo* strains were also clustered (C1 to C4) according to their quantitative virulence profiles using a hierarchical clustering approach based on pairwise Euclidian distances as displayed on the tree on the left. The susceptibility profile of the rice varieties were also clustered (R1 to R4) using the same approach as displayed on the hierarchical tree above the heatmap. (B and C) **Efficiency of rice varieties against the 14 isolates tested.** X-axis indicates the rice varieties tested. Y-axis indicates the lesions lengths in cm observed 15 days after inoculation by leaf clipping (B) or, the frequency of resistance

reactions (C) per rice varieties. (B) Overall lesion length data per rice varieties. The displayed data (box plots) corresponds to lesion lengths of three repetitions per treatment (rice varieties x isolates). Mean lesion lengths with the same letter (a to t) are not significantly different (Bonferroni test). (C) Frequency of resistance phenotypes among the rice varieties. Lesion lengths  $\leq 5$  cm are considered as resistant (R in blue), and  $> 5$  cm susceptible (S in pink).

**Figure 5. Virulence profile clustering of Malian *Xoo* isolates and the resistance level of six rice varieties tested** (A) Heatmap display of the aggregated lesion length data by isolate and by variety. For each interaction (rice varieties x *Xoo* isolates), individual cell colors code for the corresponding mean lesion length across three independent replicate of the experiment with each 6 replicate lesion length values. Pathotypes and races, plotted side by side, are color-coded in the two colored bars on the right. The lesion length data on the six rice varieties were clustered as in Figure 4 A. Likewise, the six rice varieties are grouped according to their response to infections in the hierarchical tree above the heatmap. (B and C) X-axis indicates the rice varieties tested. Y-axis indicates the lesions lengths in cm observed 15 days after inoculation by leaf clipping (B) or, frequency of resistance reactions (C) per rice varieties. (B) Overall lesion length data per rice varieties. The displayed data (box plots) corresponds to aggregated lesion lengths data from three independent replicate experiments with 6 values per treatment (rice varieties x isolates) and per experiment. Mean lesion lengths with the same letter (a to e) are not significantly different (Bonferroni test). (C) Percentage of resistance phenotypes by varieties. Lesion lengths  $\leq 5$  cm are considered as resistant (R in blue), and  $> 5$  cm susceptible (S in pink).

**Supplemental Figure 1. Overall virulence of fourteen isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on a panel of rice varieties grown in Mali.**

**Table 1.** List of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains isolated in Mali between 2010 and 2013 and used in this study.

Strain	Region	Site	Year	Host Variety	Races	Pathotypes
MAI55	Office du Niger	Niono	2010	Adny11	A4	P1
MAI64	Office du Niger	Segou Coura	2010	<i>O. longistaminata</i>	A4	P1
MAI65	Office du Niger	Dioro Coura	2010	Adny11	A4	P3
MAI68	Office du Niger	Niono	2010	Huang Huazhon	A4	P3
MAI70	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A6	P1
MAI71	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A6	P8
MAI72	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A5	P3
MAI73	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A5	P4
MAI74	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A5	P1
MAI75	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A5	P1
MAI81	Sélingué	Sélingué	2012	Wassa	A6	P3
MAI83	Sélingué	Sélingué	2012	Wassa	A5	P3
MAI92	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A5	P3
MAI93	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A7	P3
MAI94	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A5	P1
MAI95	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A6	P1
MAI96	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A7	P3
MAI98	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A8	P1
MAI99	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A8	P1
MAI100	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A5	P1
MAI101	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A4	P1
MAI102	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A6	P1
MAI103	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A5	P1
MAI104	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A6	P4
MAI105	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A4	P1
MAI106	Office du Niger	Niono	2012	Adny11	A6	P2
MAI107	Sélingué	Sélingué	2012	Wassa	A6	P4
MAI108	Sélingué	Sélingué	2012	Wassa	A6	P4
MAI127	Office du Niger	Macina 7	2013	Adny11	A9	P6
MAI128	Office du Niger	Macina Niaro	2013	Gambiaka Kokoum	A6	P5
MAI129	Office du Niger	Bewani 1	2013	Adny11	A8	P7
MAI130	Office du Niger	Bewani 2	2013	Adny11	A9	P2
MAI131	Office du Niger	Bewani 3	2013	Adny11	A9	P2
MAI132	Office du Niger	Bewani 3	2013	<i>O. barthii</i>	A9	P7
MAI133	Office du Niger	Bewani 10	2013	Kogoni91-1	A8	P4
MAI134	Office du Niger	Kala 3	2013	<i>O. longistaminata</i>	A3	P1
MAI135	Office du Niger	Kala 3	2013	<i>O. longistaminata</i>	A3	P1
MAI136	Office du Niger	Kala 9	2013	Adny11	A8	P6
MAI145	Office du Niger	Kouroumari	2013	Kogoni91-1	A6	P3
MAI146	Office du Niger	Kouroumari	2013	Kogoni91-1	A6	P3
MAI147	Office du Niger	Kalana	2013	Nionoka	A6	P3



**Table 2. Races of *Xoo* on twelve near isogenic rice lines (NILs) containing a single resistance gene in IR24 genetic background.** 45 *Xoo* strains (41 strains from this study and 4 reference strains) cluster into seven races noted A3 to A9. Using *Xa23* in NILs screening, the most dominant and heterogeneous races, A6 and A5, are subdivided into two virulence subclusters. Each race is characterized by its virulence profile on NILs and the number of strains belonging to it is indicated. The ability of *Xa* genes to control different races is displayed. R = resistant (Lesion Length  $\leq$  5cm) and S = susceptible (Lesions length  $>$  5cm). W-*Xa23*= With *Xa23* and N-*Xa23*= Without *Xa23*. S. N.: Strains number

NILs	<i>Xa</i> gene	A3	New Races of <i>Xoo</i>								Effectiveness of resistance (%)	
			A4	A5	A6		A7	A8	A9	W- <i>Xa23</i>	N- <i>Xa23</i>	
					A5-1	A5-2						A6-1
IR 24	<i>Xa18</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	11	14
IRBB 1	<i>Xa1</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	S	67	57
IRBB 3	<i>Xa3</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	89	86
IRBB 4	<i>Xa4</i>	R	R	R	R	S	S	R	S	S	56	57
IRBB 5	<i>xa5</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	22	29
IRBB 7	<i>Xa7</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	11	14
IRBB 8	<i>xa8</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	11	14
IRBB 10	<i>Xa10</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	11	14
IRBB 11	<i>Xa11</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	11	14
IRBB 13	<i>xa13</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	11	14
IRBB 14	<i>Xa14</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	11	14
IRBB 21	<i>Xa21</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	11	14
IRBB 23	<i>Xa23</i>	R	S	S	R	R	S	S	S	S	33	--
S. N. with <i>Xa23</i>		5	6	7	3	2	11	2	5	4	--	--
S. N. non <i>Xa23</i>		5	6	10		13		2	5	4	--	--

**Table 3: Geographical distribution of races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in two regions in Mali.** The number of strains belonging to each race is indicated.

Regions in Mali	Races of <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>							Strain number
	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	
Selingué	0	0	2	2	0	0	0	4
Office du Niger	5	6	9	10	2	5	4	41

**Table 4. Characterization of eight pathotypes among strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Mali.** The pathotypes are noted P1 to P8. The rice variety Azucena was used as a susceptible control. Each pathotype is characterized by its virulence profile on six rice varieties and the number of strains that belongs to it is indicated. The effectiveness of rice varieties to control pathotypes is indicated.

Rice Lines	Pathotypes								Percentage of resistance	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Pathotypes	Strains
<b>SK-20-28</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	100	100
<b>Giganté</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	100	100
<b>Kogoni 91-1</b>	R	S	R	R	S	S	S	R	50	80
<b>SK-19-34</b>	R	R	R	R	S	R	S	S	62,5	91
<b>SK-95-4</b>	R	R	R	S	R	S	R	S	62,5	84
<b>WAS 203-B</b>	R	R	S	S	R	S	S	S	37,5	56
<b>Azucena</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0
<b>No of strains</b>	20	4	11	4	1	2	2	1	--	--

**Supplemental Table 1. List of rice varieties used for resistance screening against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Mali.** Each variety is listed by subspecies, pedigree and origin (country or institution). The displayed clustering results from the analysis of the interactions between twenty-nine varieties and fourteen *Xoo*. IRRI: International Rice Research Institute, Philippines, AfricaRice: Africa Rice Center, Ivory Coast, IER: Institute of Rural Economy, Mali, PRI: Irrigated Rice Program, Mali, IITA: International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.

Rice line	Type	Pedigree	Origin	Cluster
<b>08FAN-2</b>	O. sativa indica			R1
<b>Adny11</b>	O. sativa indica		Sierra Leone	R4
<b>BG90-2</b>	O. sativa indica	Petoz/TNI/Remedja	Sri-Lanka	R4
<b>BH2</b>	O. sativa indica	HKG98 X Kading-Thang	Mali	R4
<b>Djama Jigui</b>	O. sativa indica		IITA-IER/PRI	R1
<b>DK1</b>	O. sativa indica			R1
<b>DM16</b>	O. sativa indica	D52-37 X Malobadian	Mali	R2
<b>Gambiaka kokoum</b>	O. sativa indica	From 50-39	Mali	R2
<b>Giganté</b>	O. sativa indica		AfricaRice	R1
<b>KhaoGeaw</b>	O. sativa indica		Thailand	R4
<b>Kogoni91-1</b>	O. sativa indica	Gambiaka Kokoum X IR-36	Mali	R1
<b>NERICA 4</b>	O. sativa X O. glaberima		AfricaRice	R4
<b>NERICA-L2</b>	O. sativa X O. glaberima	TOG 5681 /3 IR64	AfricaRice / Mali	R1
<b>Nionoka</b>	O. sativa indica		India-IER / PRI	R4
<b>RC-8</b>	O. sativa indica			R4
<b>Sahélika</b>	O. sativa indica	Sahélika (ECIA 36-2-2-1-4)	Cuba-IER / PRI	R4
<b>Seberang MR77</b>	O. sativa indica		Malaysia	R4
<b>SK-19-34</b>	O. sativa indica		Mali	R1
<b>SK-20-28</b>	O. sativa indica	Kogoni 91-1x Giganté	Mali	R1
<b>SK-7-8</b>	O. sativa indica	IR 36 X Giganté	Mali	R3
<b>SK-95-4</b>	O. sativa indica	BG 90-2 X Giganté	Mali	R1
<b>Swetasoké</b>	O. sativa indica		South America	R4
<b>WAAPP-L1</b>	O. sativa indica			R4
<b>WAS-197-B</b>	O. sativa indica		AfricaRice	R1
<b>WAS-203-B</b>	O. sativa indica		AfricaRice	R1
<b>WAS-49-B</b>	O. sativa indica		AfricaRice	R1
<b>WAS-62</b>	O. sativa indica		AfricaRice	R1
<b>Wassa</b>	O. sativa indica	IR- 32307-107-3-2-2	IRRI/Philippines	R1
<b>Watt 310</b>	O. sativa indica			R4

**Supplemental Table 2: Race characterization of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains.**

Each race is characterized by the NILs (IRBBs) which are significantly associated with it, its value test (V. test), its mean in category, and its P. value. This was done using the desc function of the FactoMineR package. Lesion lengths were encoded in data matrix, noting avirulence 1 or  $LL \leq 5$  and virulence 2 or  $LL > 5$ . A value test greater than 2 in absolute value means that the mean of the race is significantly different from the overall mean. A positive (or negative) sign of the value test indicates that the mean lesion length caused by isolates of a race is greater (or less) than the overall mean.

Race	NILs	V.test	Mean in category	Overall mean	sd in category	Overall sd	P.value
A3	IRBB4	-2.381176	1	1.456522	0	0.4981061	1.725746e-02
	IRBB5	-4.373214	1	1.739130	0	0.4391089	1.224306e-05
	IRBB8	-6.708204	1	1.869565	0	0.3367812	1.970344e-11
	IRBB7	-6.708204	1	1.869565	0	0.3367812	1.970344e-11
	IRBB21	-6.708204	1	1.869565	0	0.3367812	1.970344e-11
	IRBB14	-6.708204	1	1.869565	0	0.3367812	1.970344e-11
	IRBB13	-6.708204	1	1.869565	0	0.3367812	1.970344e-11
	IRBB11	-6.708204	1	1.869565	0	0.3367812	1.970344e-11
	IRBB10	-6.708204	1	1.869565	0	0.3367812	1.970344e-11
	IR24	-6.708204	1	1.869565	0	0.3367812	1.970344e-11
A4	IRBB4	-2.381176	1	1.456522	0	0.4981061	1.725746e-02
	IRBB5	-4.373214	1	1.739130	0	0.4391089	1.224306e-05
A5	IRBB5	2.234188	2	1.739130	0	0.4391089	0.0254706966
	IRBB1	-2.108293	1	1.239130	0	0.4265525	0.0350056821
	IRBB4	-3.446738	1	1.456522	0	0.4981061	0.0005673994
A6	IRBB1	2.55113	2	1.23913	0	0.4265525	0.01073743
A7	IRBB4	4.348283	2	1.456522	0	0.4981061	1.372076e-05
	IRBB5	2.367601	2	1.739130	0	0.4391089	1.790381e-02
	IRBB1	-2.234188	1	1.239130	0	0.4265525	2.547070e-02
A8	IRBB1	4.178660	2	1.239130	0	0.4265525	1.725746e-02
	IRBB4	2.555993	2	1.456522	0	0.4981061	1.224306e-05
A9	IRBB3	6.708204	2	1.086957	0	0.2817713	1.970344e-11
	IRBB1	3.692745	2	1.239130	0	0.4265525	2.218467e-04
	IRBB4	2.258770	2	1.456522	0	0.4981061	2.389771e-02

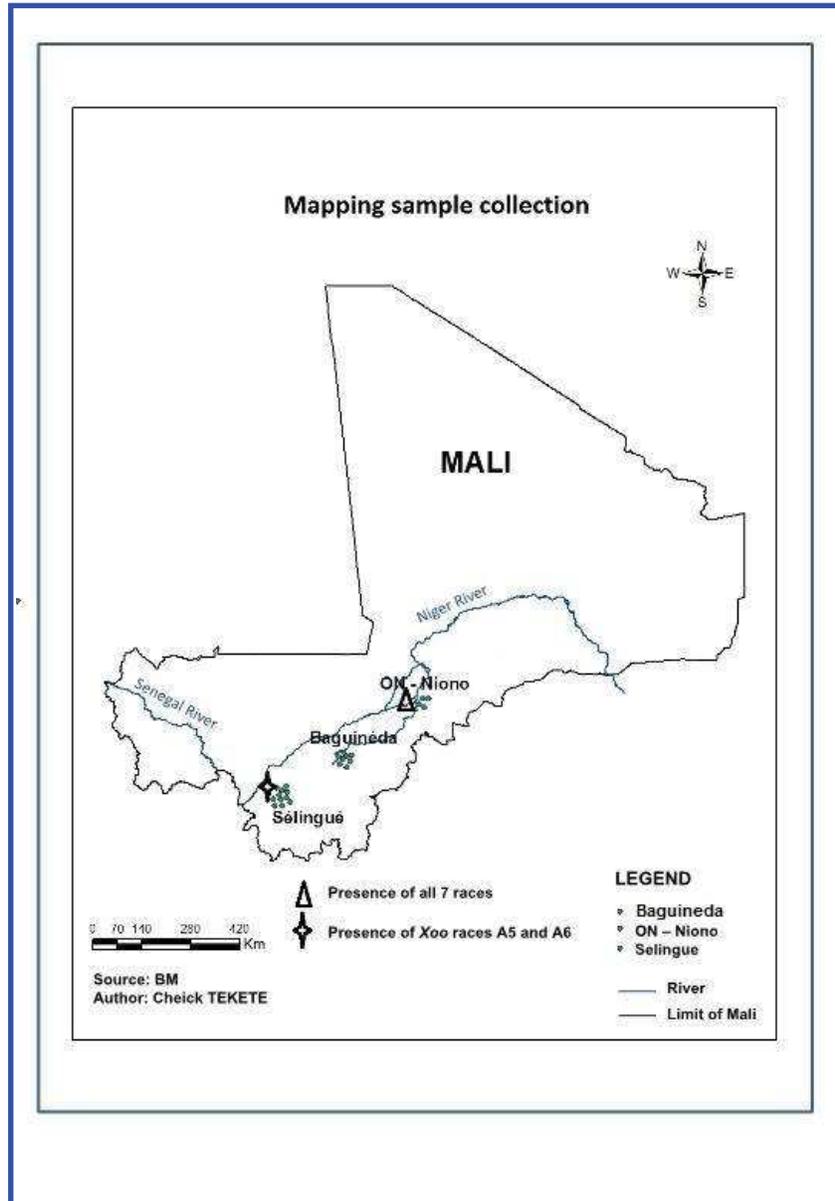


Figure 1

142x206mm (96 x 96 DPI)

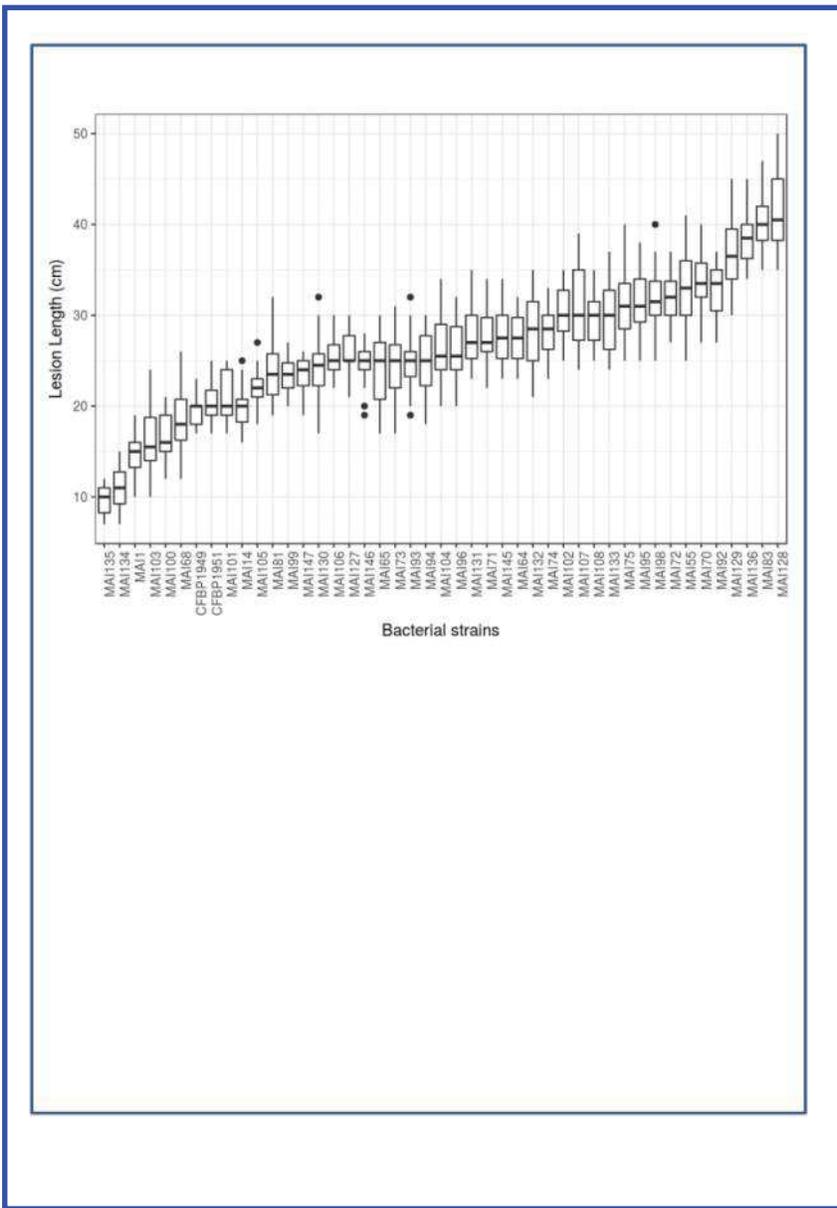


Figure 2

190x275mm (100 x 100 DPI)

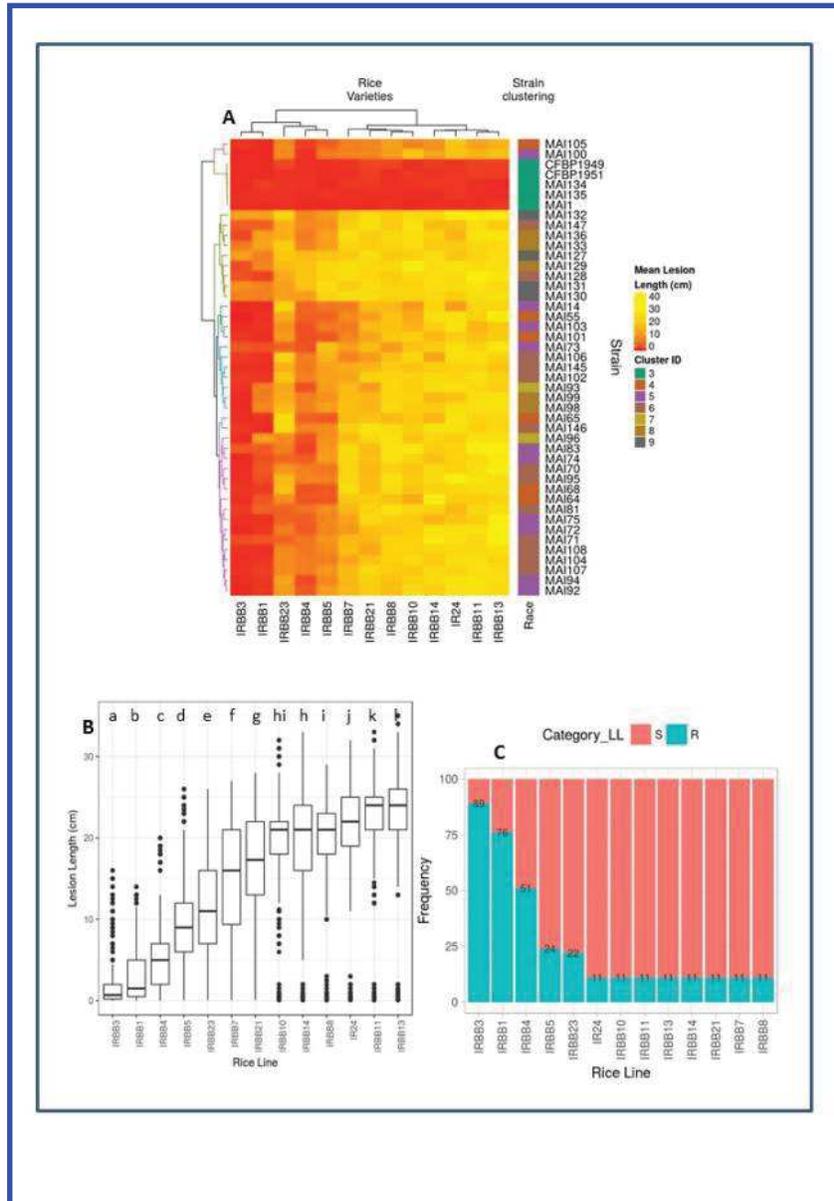


Figure 3

190x275mm (96 x 96 DPI)

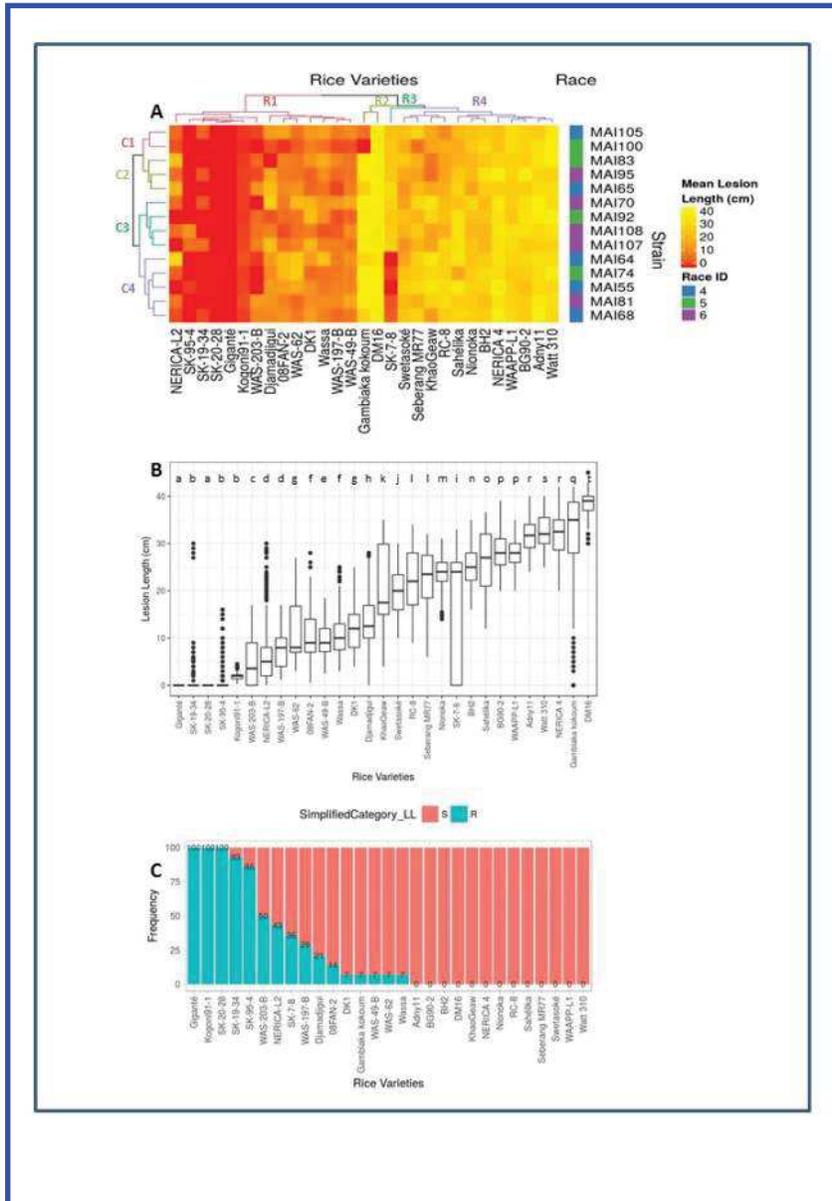


Figure 4

190x275mm (96 x 96 DPI)

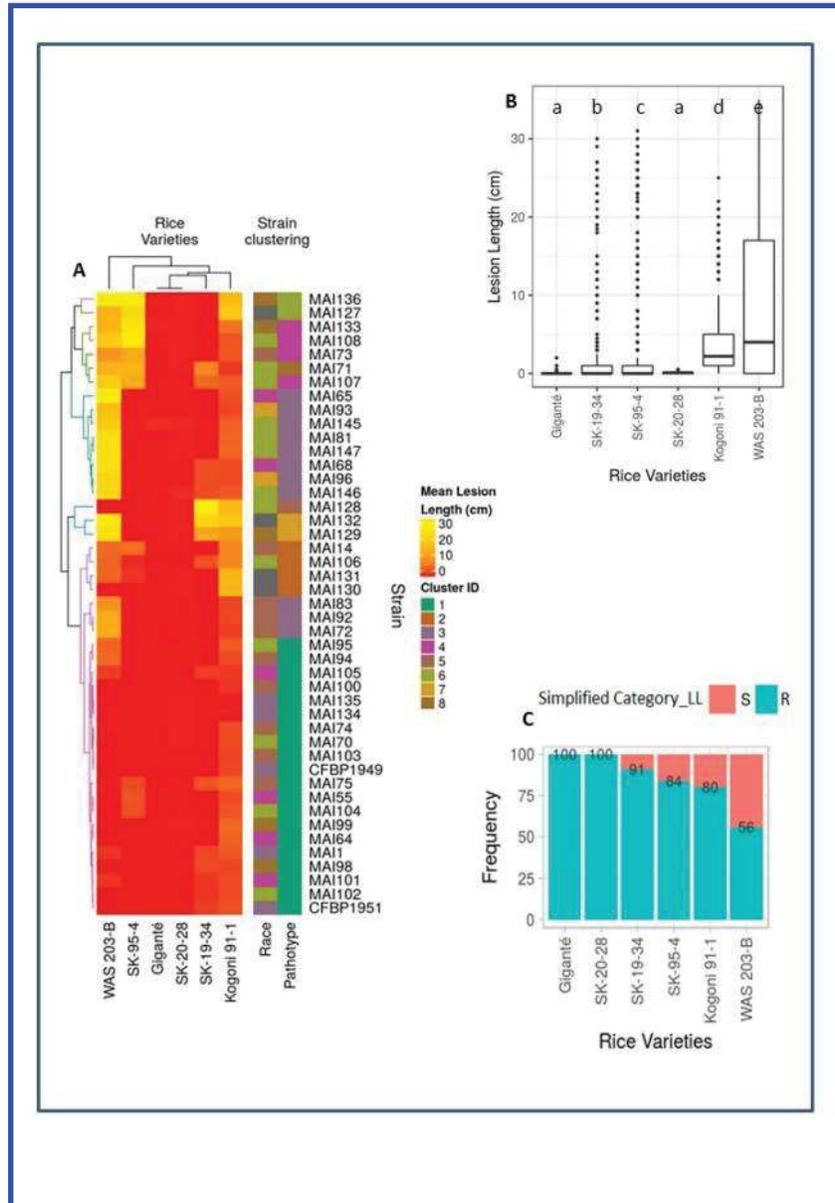
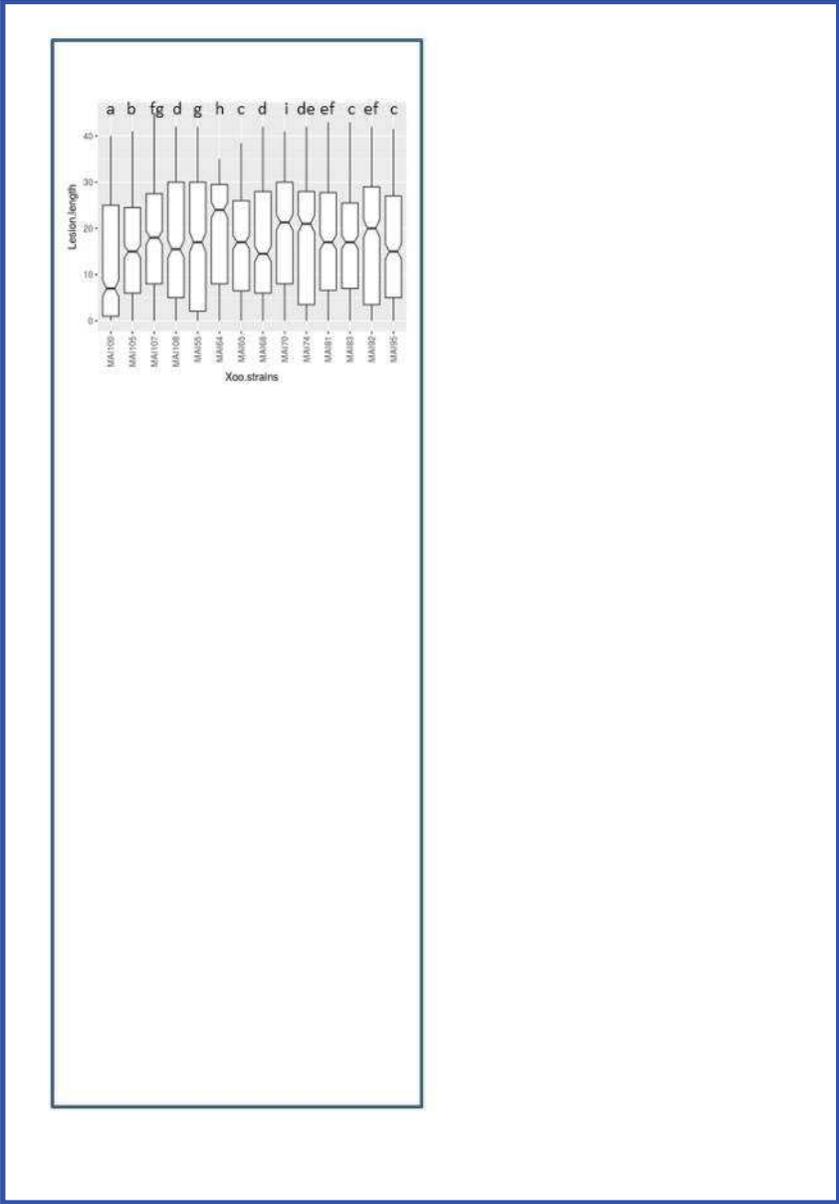


Figure 5

190x275mm (96 x 96 DPI)



Supplemental Figure 1

190x275mm (96 x 96 DPI)

## Chapitre 3

**Caractérisation des *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* au Mali et identification des sources de résistance du riz à la strie foliaire.**

## Chapitre 3 : La caractérisation des profils de virulence de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* au Mali révèle l'existence de variétés possédant une résistance à large spectre contre le BLS

Tekete C<sup>1</sup>., Cunnac, S<sup>2</sup>., Doucouré, H<sup>1</sup>., Dembele, M<sup>3</sup>., Keita, I<sup>1</sup>., Sarra, S<sup>3</sup>., Karim, D<sup>3</sup>., Koita, O<sup>1</sup>., Verdier, V<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>University of Sciences, Techniques and Technologies of Bamako (USTT-B), Faculty of Science and Technology (FST), Applied Molecular Biology Lab (LBMA), Bamako, Mali

<sup>2</sup>IRD, CIRAD, Univ. Montpellier, IPME, Montpellier, France

<sup>3</sup>Institute of Rural Economy (IER), Regional Center for Agronomic Research (CRR), Niono and Bamako, Mali

### Résumé

Comprendre la diversité des groupes de virulence des populations d'agents pathogènes dans les paysages rizicoles est primordial pour définir la stratégie de gestion adaptée et soutenir les efforts d'amélioration de la résistance variétale du riz. Pour apporter une réponse adéquate à l'émergence de la strie foliaire au Mali, nous avons étendu notre collection de souches de la bactérie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) responsable de la maladie. Les 28 isolats du pathogène, collectés entre 2010 et 2013 dans les grands centres de riziculture, Baguineda, Selingue et Office du Niger, ont été classés dans quatre groupes de virulence sur la lignée sensible témoin, Kitaake. L'évaluation de la capacité du transgène Rxo1 à conférer une protection contre ces souches a montré que certaines, dépourvues de l'effecteur correspondant *avrRxo1*, contournent cette résistance. Ce transgène ne peut donc être déployé seul au Mali pour le contrôle de la maladie. Afin d'identifier de nouvelles sources de résistance à large spectre, nous avons criblé vingt-neuf variétés de riz cultivé avec 6 isolats. Dans un second temps, les 7 variétés les plus résistantes ont été testées avec l'ensemble des isolats en collection. L'analyse qualitative des données de virulence issues de ce criblage variétal a conduit à la répartition des isolats en 11 pathotypes, alors que l'analyse quantitative suggérait 4 groupes de virulence. Une source très efficace, à large spectre de résistance contre l'ensemble des isolats de la collection malienne de *Xoc* a été localisée dans la variété SK20-28 et son parent Giganté. Le second parent de croisement, Kogoni 91-1, ne possède pas cette résistance, suggérant un possible transfert du caractère de résistance de Giganté à SK20-28. La diversité des profils de virulence de *Xoc* caractérisée dans la présente étude et l'identification d'une source de type BSR dans les variétés de riz local fournissent des informations essentielles pour le développement de programme de sélection variétale efficace pour le contrôle de la strie foliaire au Mali.

**Les mots clés:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, strie foliaire, Résistance variétale du riz,

## 1. Introduction:

La strie foliaire (BLS) causée par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) est une maladie émergente dans les périmètres rizicoles du Mali. Elle a été signalée pour la première fois en Afrique dans les années 1980, et a été observée sur des variétés de riz cultivées, sauvages et sur des adventices. En Uganda, l'incidence de la maladie a atteint 80, 40 et 30% respectivement à Doho, Nambale et Magada (Afolabi et al. 2014). Ces infections ont pris de l'importance en Chine et en Afrique (Gonzalez et al. 2007; Verdier, et al. 2012) et réduisent régulièrement le rendement de 10 à 20% et dans certaines conditions favorables, occasionnent des pertes allant jusqu'à 40% (Kang et al. 2008; Niño-Liu, Ronald, et Bogdanove 2006). A la différence du pathovar *oryzae*, *Xoc* pénètre dans les feuilles par le biais des stomates ou de blessures et colonise préférentiellement les espaces intercellulaires du mésophylle. Cette bactérie utilise le système de sécrétion de type III pour transloquer des protéines effectrices dans la cellule végétale et détourner les processus biologiques de l'hôte afin de créer des conditions favorables à sa colonisation (Bogdanove et al. 2011).

Les premières analyses sur les souches maliennes de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ont révélé que ces populations sont phénotypiquement et génétiquement diverses (Gonzalez et al. 2007). A partir d'une collection de plusieurs dizaines de souches en provenance de diverses régions du Monde et des pays tels que le Mali et le Burkina en Afrique ou la Chine, les Philippines et la Malaisie en Asie, Wonni et al. (2014) ont étudié plus précisément la position phylogénétique des souches africaines de *Xoc*. Sur la base d'une étude MLSA impliquant six gènes de ménage, l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) utilisant l'effecteur TAL *avrXa7* comme sonde, ou encore l'analyse des produits de PCR de deux gènes codant pour des effecteurs de type III conservés (*xopAJ* et *xopW*), cette étude a observé que les souches africaines de *Xoc* sont diverses et évoluent rapidement, avec un groupe endémique en Afrique et un autre pouvant provenir des populations asiatiques. Il avait également été rapporté sur la base d'une étude MLVA (*Multiple Loci Variable number of tandem repeat Analysis*) que les souches de *Xoc* asiatiques sont distinctes de celles d'Afrique, et que certaines souches asiatiques pourraient avoir une origine africaine (Hajri et al. 2012).

Pour contrôler la maladie, la résistance variétale apparaît comme une approche efficace de gestion des populations pathogènes. En dépit de l'efficacité de cette approche, aucun gène majeur de résistance contre ces pathogènes n'a été encore identifié à ce jour chez le riz. Cependant, plusieurs QTLs ont été caractérisés sur différents chromosomes du riz pour le contrôle de la maladie (Chen et al. 2006; Han et al. 2008; Tang et al. 2000; Bossa-Castro et al. 2018). Un gène de résistance récessif, *bls1*, a été localisé sur le chromosome 6 de *Oryza rufipogon* (Wen-Ai et al. 2012). Sa réaction par rapport aux isolats d'Afrique n'est pas bien connue (Jeung et al. 2006; Lee et al. 2003). Bien que le transgène *Rxo1*, isolé du maïs, confère au riz, une immunité contre les souches de *Xoc* porteuses du gène d'avirulence, *avrRxo1* (Zhao et al. 2004; 2005), la plupart des souches africaines en sont dépourvues (Gonzalez et al. 2007;

Hajri et al. 2012; Zhao et al. 2004), suggérant que ce transgène R n'aurait pas une grande efficacité pour le contrôle de la maladie en Afrique.

L'émergence de la strie foliaire dans les pays producteurs de riz rend nécessaire l'orientation des objectifs de recherche vers l'identification des sources à large spectre de résistance contre le pathogène responsable. Les collections de ressources génétiques de la culture constituent d'excellents réservoirs de gènes R. Le criblage des variétés de riz cultivées qui ont coexisté avec les populations pathogènes au Mali possède donc un bon potentiel pour identifier des résistances appropriées pour un contrôle durable des populations de *Xoc*.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Collection des isolats de *X. oryzae pv. oryzicola*:

Entre 2010 et 2013 et sur la base d'un échantillonnage aléatoire simple, nous avons collecté les feuilles de riz portant des symptômes de BLS dans les trois grands centres de riziculture au Mali: Office du Niger, Baguinéda et Sélingué (Chapitre 2, Tekete et al. page 27). Les échantillons ont été étiquetés pour enregistrer la date de collecte, la plante hôte, le site, les données GPS et stockés à -20°C au laboratoire. Une trentaine d'échantillons ont été traités afin d'isoler les bactéries sur milieu de culture PSA suivant la méthode décrite par Adhikari et al. (1994) avec une légère modification. Un fragment de 5 cm d'échantillon de feuille infectée a été brièvement désinfecté en surface, puis macéré avec un homogénéisateur dans un sac en plastique (Bioreba) contenant de l'eau stérile. Le macérât a été incubé à 4 ° C pendant 30 minutes à 1 heure, et ensuite, les dilutions à 1/10, 1/100 et 1/1000 ont été étalées sur un milieu semi-sélectif, PSA (peptone 10 g / l, saccharose 10 g / l, acide glutamique 1 g / l, bacto agar 16 g / l, actidione 50 mg / l, céphalexine 40 mg / l et 20 mg / l de kasugamycine). Les cultures bactériennes ont été incubées pendant 3 jours à 28 ° C. Des colonies individualisées, jaunes pâles, rondes, lisses, bombées et mucoïdes, ont été isolées et purifiées par deux passages sur milieu PSA. Pour confirmer l'appartenance des isolats à l'espèce *Xanthomonas oryzae* et au pathovar *oryzicola*, une PCR multiplexe sur colonies a été utilisée suivant la méthode développée par Lang et al. (2010). L'amplification a été faite en utilisant un thermocycleur MJ Research PTC-200 selon les conditions décrites par Lang et al. (2010) et la visualisation des amplicons a été réalisée sur un gel à 1,5% d'agarose à l'aide d'un dispositif Kodak doté du logiciel EDAS™. Une seule colonie bactérienne dont l'appartenance au pathovar *Xoc* est confirmée par PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne), est ensuite sélectionnée par échantillon et étiquetée suivant la nomenclature adoptée en 2003 (Gonzalez et al. 2007) pour la codification des isolats de la collection malienne de *X. oryzae* (*Xoo* et *Xoc*). Ce code est constitué de MAI (pour Mali IRD) suivi d'un

numéro de référence allant de 1 à n. La souche de référence, *Xoc* MAI10, isolée au Mali en 2003 (Gonzalez et al. 2007) a été utilisée comme témoin.

## 2.2. Tests de pathogénicité:

La pathogénicité des isolats de *Xoc* a été évaluée sur la variété sensible témoin Kitaake. L'efficacité de la résistance du transgène *Rxo1* exprimé chez Kitaake (Kitaake *Rxo1*), a été évaluée dans les conditions contrôlées en serre à l'IRD de Montpellier. La température était maintenue à  $27 \pm 1$  °C avec une durée journalière de 12 h et une humidité relative de 80%. La souche *Xoc* BLS256 Philippines a été également testée en conditions contrôlées (IRD Montpellier).

Pour caractériser les profils de virulence des isolats et identifier une source à large spectre de résistance contre *Xoc*, nous avons évalué la résistance de vingt-neuf variétés de riz cultivées au Mali (cf. article chapitre 2). Les graines ont été obtenues auprès du programme de sélection variétale du riz de l'Institut d'économie rurale (IER, Mali).

Les conditions d'expérimentations sont identiques à celles décrites dans l'article Tekete et al. (Chapitre 2). Les essais de criblage variétal ont été conduits en pots à la station d'expérimentation agricole du centre de l'IER à Sotuba. Des plants de deux semaines ont été transplantés dans des pots de 10 kg remplis de terreaux suivant un dispositif expérimental en split plot avec trois répétitions indépendantes de deux semaines d'écart entre les dates de semis. Le terreau utilisé vient de la décomposition naturelle de la matière organique de la forêt du centre du pays. Les expériences ont été réalisées en hivernage (entre juin et octobre) pour bénéficier de la forte humidité relative. La valeur moyenne de cette humidité était de 74% pour un maximum de 88% et un minimum de 61%. La température moyenne était de 28,05°C, soit 22,96°C de minimum et 33,15°C de maximum. Environ 3 g d'engrais DAP (phosphate de diammonium: 18-46-0) ont été utilisés 3 fois par pot les 15<sup>ème</sup>, 25<sup>ème</sup> et 35<sup>ème</sup> jours après le semis. La souche *Xoc* MAI10 (Gonzalez et al. 2007) a été utilisée comme contrôle positif et l'eau distillée stérile comme contrôle négatif. L'inoculum a été préparé avec de l'eau distillée stérile et des cellules bactériennes cultivées sur milieu PSA gélosé pendant 24h, avant d'être ajusté à une densité optique (DO 600) de 0,2, soit  $10^8$  UFC/mL, à l'aide du spectrophotomètre Biophotometer. 6131 (Eppendorf, Allemagne).

Les deux dernières feuilles des plantes de 3 semaines (21 jours) ont été inoculées par infiltration à l'aide d'une seringue d'un millimètre sans aiguille (BD 1ml syringe tuberculin Slip Tip, Ref. 309659). Au moins deux infiltrations ont été effectuées par feuille. Un total de 6 plantes, soit 12 feuilles par variété de riz ont été inoculées avec chaque isolat. Une couche d'eau de 5 cm d'épaisseur a été maintenue sous les plantes afin de maximiser l'humidité relative. Les observations ont été effectuées 12 jours après infiltration. Les mesures des longueurs de lésion (LL) ont été faites en millimètre (mm). Les longueurs de lésion moyenne  $\leq$

5 mm ont été classées résistantes (R) et sensibles (S) lorsqu'elles dépassaient les 5 mm, soit supérieures (>) à 5 mm.

### 2.3. Analyse statistique des données:

Les données de virulence observées ont été utilisées pour étudier les réactions des variétés de riz à l'inoculation des isolats de la collection Malienne de *Xoc*. Les isolats ont été regroupés en pathotypes suivant leur profil de virulence sur les variétés testées à l'aide d'une matrice de valeurs d'indice associée à la virulence des isolats et générée en notant "1" lorsque  $LL \leq 5$  mm et "2" lorsque  $LL > 5$  mm.

Les longueurs de lésion pour chaque combinaison de riz / isolat ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs suivi du test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher. Le niveau de signification du LSD a été estimé à 5%. L'analyse comparative des moyennes des lésions a été faite à l'aide du test de Bonferroni sous le logiciel GenStat. Ces données ont été analysées sous le logiciel statistique R pour produire une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH). La classification Hiérarchique sur les Composantes Principales (HCPC) a été réalisée à l'aide du logiciel FactoMineR (Cornillon et al. 2012). La distance choisie est la distance euclidienne et la méthode d'agrégation, celle de Ward. Les heatmaps ont été construits et visualisés avec le package ComplexHeatmap.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Collecte des isolats maliens et évaluation de leur pouvoir pathogène sur la lignée sensible Kitaake:

Des missions de collectes ont été conduites pendant les mois de Septembre de 2010 à 2013, dans les trois grands centres de production de riz au Mali, Baguineda, Sélingué et l'Office du Niger (Figure 1 du papier race, Chapitre 2). Pendant cette période, un total de 35 échantillons de plusieurs feuilles de riz portant des symptômes de BLS a été collecté. La maladie a été observée dans toutes les zones visitées (Tableau 1).

Une feuille par échantillon a été utilisée pour l'étape d'isolement des bactéries pathogènes responsables de la maladie. Au total, vingt-huit isolats de *Xoc*, formant des colonies jaunes pâles, rondes, lisses, entières, bombées et mucoïdes sur un milieu PSA, ont été isolés et confirmés par PCR multiplex entre 2010 et 2013 (Tableau 1). Ce tableau contient également les numéros d'identification des isolats, leurs années de collecte et les plantes hôtes pour la double conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$  au LBMA/Bamako et à l'IRD/Montpellier, afin de minimiser les risques de perte. Les isolats ont été collectés majoritairement sur les variétés élites adoptées par les producteurs (Tableau 1).

Ces pathogènes causent également la maladie sur les espèces sauvages, *Oryza barthii* sur lequel le gène *R xa41(t)* a été identifié (Hutin et al. 2015), et *Oryza longistaminata* (tableau 1) dont certaines accessions possèdent une résistance contre BB et qui ont permis le clonage de *Xa21* <https://www.grain.org/en/article/52-bb-rice-irri-s-first-transgenic-field-test>. Au Mali, des missions de collecte ultérieures orientées sur les plantes réservoirs et réalisées en 2016 dans nos trois régions d'étude, ont révélé que les réseaux de drainage non curés des systèmes d'irrigation contrôlés étaient peuplés par des herbes et riz sauvages porteurs des symptômes de la maladie et colonisés par des souches de *Xoc* similaires à celles rencontrées en plein champ.

Pour confirmer leur pouvoir pathogène, les 28 isolats obtenus de 2010 à 2013 ainsi que neuf souches isolées entre 2003 et 2009 (Gonzalez et al. 2007; Wonni et al. 2014), ont été testés par infiltration sur la lignée de riz sensible Kitaake. Tous les isolats ont causé des symptômes typiques de BLS 10 à 15 jours après inoculation. La longueur des lésions provoquées par les isolats variait de 5 à 37 mm (Figure 1). L'analyse de variance à un facteur sur les données de virulence sur Kitaake, a révélé une différence significative entre les isolats ( $p < 0,001$ ). Les données PCR et de pouvoir pathogène confirment que les 28 agents pathogènes isolés durant la présente étude, appartiennent au pathovar *Xoc* (tableau 1).

### 3.2. Le criblage de la variété Kitaake *Rxo1* révèle que le transgène ne peut être déployé au Mali

Pour contrôler l'émergence du BLS au Mali, le déploiement de la résistance variétale semble être l'alternative la mieux indiquée pour une meilleure gestion des populations pathogènes. Cependant, l'amélioration de la résistance variétale du riz, repose essentiellement sur le transfert des sources de résistance les plus efficaces dans les variétés adoptées par les paysans producteurs. A ce jour, aucun gène R n'est connu pour son efficacité contre les populations maliennes de *Xoc*. Afin d'évaluer l'efficacité du transgène *Rxo1* contre la strie foliaire au Mali, nous avons criblé les souches de notre collection sur la lignée transgénique Kitaake *Rxo1* (Tableau 1). Il apparaît que ce transgène n'est pas efficace contre les souches *Xoc* du Mali. En effet, il est inopérant sur 14 % des isolats de la collection de 2010 à 2013 (Tableau 1).

Le génome de ces souches semble par ailleurs être dépourvu d'*avrRxo1*, l'effecteur d'avirulence correspondant (tableau 1). D'autres auteurs ont précédemment décrit cette inefficacité de *Rxo1* vis à vis des populations africaines de *Xoc* alors qu'il est potentiellement très efficace contre celles d'Asie (Gonzalez et al. 2007; Hajri et al. 2012; Zhao et al. 2004), suggérant une spécificité de la résistance contre BLS en fonction de l'origine géographique des souches de *Xoc*.

### 3.3. Un crible des variétés cultivées au Mali pour la résistance contre BLS révèle que SK20-28 et Giganté possèdent une résistance large contre les onze pathotypes de la collection Malienne de *Xoc*

Pour relever le défi de la résistance contre la maladie au Mali, nous avons criblé vingt-neuf variétés cultivées pour leur résistance/sensibilité vis à vis de 6 isolats sélectionnés dans la collection du laboratoire en fonction de leur site de collecte (Figure 2). Il en résulte que la plupart des variétés cultivées au Mali (au nombre de 19) sont sensibles à la maladie (Figure 2, A, B et C). D'autres (au nombre de 5) sont différentielles, c'est-à-dire que leur niveau de sensibilité est contrasté en fonction de la souche inoculée (Tableau 2). Enfin, cinq variétés se sont révélées largement résistantes aux 6 souches testées (Tableau 2). Afin d'affiner cette première observation, ces 5 variétés résistantes, plus deux différentielles et deux sensibles, soit 9 au total, ont été criblées une seconde fois pour leur résistance contre l'ensemble des souches *Xoc* de la collection malienne (Figure 3 A).

L'analyse de variance à deux facteurs sur les données de virulence des 38 isolats sur les 9 variétés a révélé une différence significative entre les isolats ( $p < 0,001$ ). De même, les variétés portent des sources de résistance significativement différentes ( $p < 0,001$ ). Les interactions entre les variétés et les souches sont également différentes. Cependant, le test de Bonferroni montre que les variétés portant la lettre « a » possèdent le même niveau de résistance (Figure 3 B). De même, toutes les autres moyennes de lésion qui partagent la même lettre, ont un niveau de sensibilité similaire (Figure 3 B).

Les longueurs de lésion ont été codifiées en variables qualitatives et notés « 1 » lorsque les longueurs moyenne de la lésion sont  $\leq 5$  mm (les plantes porteuses de la lésion sont dites résistantes ou R) ou « 2 » lorsque les longueurs moyenne de la lésion sont  $> 5$  mm (les plantes porteuses de la lésion sont dites sensibles ou S).

L'analyse de cluster des données qualitatives de virulence des isolats sur les 5 variétés différentielles (Tableau 3) a révélé l'existence de onze pathotypes, notés de P1 à P11 (Tableau 1 et 3, Figure 3 A), dans la collection Malienne de *Xoc*. Le pathotype P1, contrôlé par 7 variétés, est prédominant avec 32% des isolats testés (Tableau 3). Il est suivi par le pathotype P2, caractérisé par sa virulence sur la variété WAS203-B, avec 16% des isolats (Tableau 3).

Les variétés Djamadjigui et Kitaake se sont avérées sensibles à tous les isolats testés soit onze pathotypes (Tableau 3, Figure 3 A, B et C). Une source à large spectre de résistance contre les onze pathotypes, est identifiée chez la variété SK20-28 et son parent Giganté (Tableau 3, Figure 3 A, B et C). Ces deux variétés possèdent le même niveau de résistance contre les *Xoc* et *Xoc* (Test de Bonferroni, Figure 3, Supplemental figure 1; tekete et al, 2019, Chapitre 2).

Le second parent, Kogoni 91-1, bien que portant une résistance contre la plupart des souches de *Xoo* (tekete et al, 2019, Chapitre 2), est très sensible aux souches de *Xoc* (Tableau 2). Il serait alors intéressant d'orienter les objectifs de recherche vers la caractérisation de(s)

gène(s) qui déterminent la résistance de SK20-28 et Giganté. Cependant, sous serre, en conditions contrôlées à Montpellier, aucune des variétés testées, y compris SK20-28 et Giganté, ne contrôle la souche des Philippines, *Xoc* BLS256 consistant à elle seule le pathotype P12 (Tableau 3). Il faudrait donc éviter autant que possible l'introduction des souches asiatiques de *Xoc* au Mali, ce qui pourrait arriver à la faveur des échanges de graines.

**En conclusion**, les informations fournies par l'analyse des profils de virulence des souches de *Xoc*, l'analyse de l'efficacité du transgène de résistance *Rxo1* et le crible des variétés cultivées, constituent la base des connaissances permettant le développement d'un programme de sélection de la résistance variétale vis à vis du BLS au Mali.

#### 4. Références bibliographiques :

Adhikari, T. B., T. W. Mew, et P. S. Teng. 1994. « Phenotypic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* in Nepal ». *Plant Disease (USA)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9434820>.

Afolabi, O., B. Milan, L. Poulin, J. Ongom, B. Szurek, R. Koebnik, et D. Silue. 2014. « First Report of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Causing Bacterial Leaf Streak of Rice in Uganda ». *Plant Disease* 98 (11): 1579-1579. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0745-PDN>.

Bogdanove, A J., R Koebnik, H Lu, A Furutani, S V. Angiuoli, P B. Patil, M-A V Sluys, et al. 2011. « Two New Complete Genome Sequences Offer Insight into Host and Tissue Specificity of Plant Pathogenic *Xanthomonas* Spp. » *Journal of Bacteriology*, juillet, JB.05262-11. <https://doi.org/10.1128/JB.05262-11>.

Bossa-Castro, A M., C Tekete, C Raghavan, E E. Delorean, A Dereeper, K Dagno, O Koita, et al. 2018. « Allelic variation for broad-spectrum resistance and susceptibility to bacterial pathogens identified in a rice MAGIC population ». *Plant Biotechnology Journal* 16 (9): 1559-68. <https://doi.org/10.1111/pbi.12895>.

Chen, C-H, W Zheng, X-M Huang, D-P Zhang, et X-H Lin. 2006. « Major QTL Conferring Resistance to Rice Bacterial Leaf Streak ». *Agricultural Sciences in China* 5 (3): 216-20. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(06\)60041-2](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(06)60041-2).

Gonzalez, C, B Szurek, C Manceau, T Mathieu, Y Séré, et V Verdier. 2007. « Molecular and Pathotypic Characterization of New *Xanthomonas oryzae* Strains from West Africa ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (5): 534-46. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0534>.

Hajri, A., Brin C., Zhao S., David P., Feng J., Koebnik, R., Szurek, B., Verdier, V., Boureau, T., et Poussier S. 2012. « Multilocus Sequence Analysis and Type III Effector Repertoire Mining

Provide New Insights into the Evolutionary History and Virulence of *Xanthomonas oryzae* ». *Molecular Plant Pathology* 13 (3): 288-302. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00745.x>.

Han, Qing-Dian, Zhi-Wei Chen, Yun Deng, Tao Lan, Hua-Zhong Guan, Yuan-Lin Duan, Yuan-Chang Zhou, Min-Chuan Lin, et Wei-Ren Wu. 2008. « Fine Mapping of qBlSr5a, a QTL Controlling Resistance to Bacterial Leaf Streak in Rice ». *Acta Agronomica Sinica* 34 (4): 587-90. [https://doi.org/10.1016/S1875-2780\(08\)60023-1](https://doi.org/10.1016/S1875-2780(08)60023-1).

Hutin, Mathilde, François Sabot, Alain Ghesquière, Ralf Koebnik, et Boris Szurek. 2015. « A Knowledge-Based Molecular Screen Uncovers a Broad-Spectrum OsSWEET14 Resistance Allele to Bacterial Blight from Wild Rice ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 84 (4): 694-703. <https://doi.org/10.1111/tpj.13042>.

Jeung, J. U., S. G. Heu, M. S. Shin, C. M. Vera Cruz, et K. K. Jena. 2006. « Dynamics of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Populations in Korea and Their Relationship to Known Bacterial Blight Resistance Genes ». *Phytopathology* 96 (8): 867-75. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0867>.

Kang, M. J., J. K. Shim, M. S. Cho, Y. J. Seol, J. H. Hahn, D. J. Hwang, et D. S. Park. 2008. « Specific Detection of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola* in Infected Rice Plant by Use of PCR Assay Targeting a Membrane Fusion Protein Gene. » *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18 (9): 1492-95.

Lang, J M., J P. Hamilton, M G Q. Diaz, M A Van Sluys, M. R G. Burgos, C M. Vera Cruz, C. R Buell, N A. Tisserat, et J E. Leach. 2010. « Genomics-Based Diagnostic Marker Development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* ». *Plant Disease* 94 (3): 311-19. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0311>.

Lee, K. S., S. Rasabandith, E. R. Angeles, et G. S. Khush. 2003. « Inheritance of Resistance to Bacterial Blight in 21 Cultivars of Rice ». *Phytopathology* 93 (2): 147-52. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.2.147>.

Tang, D., W. Wu, W. Li, H. Lu, et A. J. Worland. 2000. « Mapping of QTLs Conferring Resistance to Bacterial Leaf Streak in Rice »: *Theoretical and Applied Genetics* 101 (1-2): 286-91. <https://doi.org/10.1007/s001220051481>.

Verdier, V, C Vera Cruz, et J E. Leach. 2012. « Controlling rice bacterial blight in Africa: Needs and prospects ». *Journal of Biotechnology, Biotechnology for enhancing plant production and food quality - IBS 2010 Part III*, 159 (4): 320-28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.020>.

Wen-Ai, He, Da-hui Huang, Rong-bai Li, Yong-fu Qiu, Jian-dong Song, Hai-ning Yang, Jia-xing Zheng, et al. 2012. « Identification of a Resistance Gene bls1 to Bacterial Leaf Streak in Wild Rice *Oryza rufipogon* Griff. » *Journal of Integrative Agriculture* 11 (6): 962-69. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60087-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60087-2).

Wonni, I., B. Cottyn, L. Detemmerman, S. Dao, L. Ouedraogo, S. Sarra, C. Tekete, et al. 2014. « Analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Population in Mali and Burkina Faso Reveals a High Level of Genetic and Pathogenic Diversity ». *Phytopathology* 104 (5): 520-31. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0213-R>.

Xie, G. L., et T. W. Mew. 1998. « A Leaf Inoculation Method for Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* from Rice Seed ». *Plant Disease* 82 (9): 1007-11. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.9.1007>.

Zhao, Bingyu, Edna Y. Ardales, Asuncion Raymundo, Jianfa Bai, Harold N. Trick, Jan E. Leach, et Scot H. Hulbert. 2004. « The *avrRxo1* Gene from the Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Confers a Nonhost Defense Reaction on Maize with Resistance Gene *Rxo1* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (7): 771-79. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.7.771>.

Zhao, Bingyu, Xinghua Lin, Jesse Poland, Harold Trick, Jan Leach, et Scot Hulbert. 2005. « A Maize Resistance Gene Functions against Bacterial Streak Disease in Rice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (43): 15383-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503023102>.

## Les tableaux

Tableau 1: Liste des souches de *Xoc* isolées au Mali entre 2010 et 2013 et utilisées dans cette étude.

Strain	Origin/Site	Year	Host	Rxo1	avrRxo1	Pathotypes
<b>MAI 3</b>	Niono	2003	<i>O.sativa</i>	R	+	<b>P3</b>
<b>MAI 25</b>	Kogoni	2009	<i>O.longistaminata</i>	R	+	<b>P4</b>
<b>MAI 29</b>	Macina	2009	<i>O.sativa</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 46</b>	Baguineda	2009	<i>O.sativa</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 138</b>	Kogoni	2009	<i>Oryza longistaminata</i>	R	+	<b>P2</b>
<b>MAI 139</b>	Kogoni	2009	<i>Oryza barthii</i>	R	+	<b>P6</b>
<b>MAI 140</b>	Kogoni	2009	<i>Oryza barthii</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 143</b>	Macina	2009	<i>O.sativa JKRH 1220</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 59</b>	Diabali	2010	<i>O.sativa Kogoni91-1</i>	15mm	-	<b>P1</b>
<b>MAI 61</b>	Madina	2010	<i>O.sativa Kogoni91-1</i>	R	+	<b>P8</b>
<b>MAI 62</b>	Madina	2010	<i>O.sativa Kogoni91-1</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 67</b>	Niono	2010	<i>O.sativa Hunguang (17)</i>	R	+	<b>P10</b>
<b>MAI 90</b>	Niono	2012	<i>O.sativa Kogoni91-1</i>	R	+	<b>P2</b>
<b>MAI 76</b>	Baguineda	2012	<i>O.sativa Seberang</i>	17mm	-	<b>P7</b>
<b>MAI 109</b>	Baguinéda	2012	<i>O.sativa BG</i>	R	+	<b>P2</b>
<b>MAI 111</b>	Baguinéda	2012	<i>O.sativa BG</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 113</b>	Baguinéda	2012	<i>O.barthii</i>	R	+	<b>P8</b>
<b>MAI 114</b>	Baguineda	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 116</b>	Baguinéda	2012	<i>O.sativa Seberang</i>	R	+	<b>P2</b>
<b>MAI 78</b>	Sélingué S11	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P4</b>
<b>MAI 79</b>	Sélingué S11	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P7</b>
<b>MAI 80</b>	Sélingué S11	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 82</b>	Sélingué S16	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 84</b>	Sélingué S20	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P4</b>
<b>MAI 85</b>	Sélingué S11	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P1</b>
<b>MAI 87</b>	Sélingué S20	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P4</b>
<b>MAI 89</b>	Sélingué S16	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	16mm	-	<b>P2</b>
<b>MAI 118</b>	Macina 5A	2013	<i>Oryza longistaminata</i>	R	+	<b>P6</b>
<b>MAI 119</b>	Macina 5B	2013	<i>Oryza longistaminata</i>	R	+	<b>P3</b>
<b>MAI 120</b>	Macina 8	2013	<i>O.sativa BG90-2</i>	R	+	<b>P5</b>
<b>MAI 122</b>	Bewani 9	2013	<i>O. barthii</i>	R	+	<b>P3</b>
<b>MAI 123</b>	Bewani 0	2013	<i>O.sativa Gamb. kokoum</i>	R	+	<b>P11</b>
<b>MAI 124</b>	Kala 6	2013	<i>O.sativa Wassa</i>	15mm	-	<b>P1</b>
<b>MAI 125</b>	Sabalibougou	2013	<i>O.barthii</i>	R	+	<b>P3</b>
<b>MAI 77</b>	Sélingué	2012	<i>O.sativa Wassa</i>	R	+	<b>P9</b>
<b>MAI 66</b>	O.Niger	2010	<i>O.sativa Kogoni91-1</i>	R	+	<b>P4</b>
<b>MAI10</b>	O.Niger	2003				<b>P2</b>
<b>BLS256</b>	Philippines			R	+	<b>P12</b>

Tableau 2: Phénotype des variétés évaluées avec 6 souches de *Xoc*

RICE LINE	MAI59	MAI66	MAI76	MAI80	MAI82	MAI89	R/S
<b>GIGANTÉ</b>	R	R	R	R	R	R	Résistantes
<b>SK-20-28</b>	R	R	R	R	R	R	
<b>ADNY11</b>	R	R	R	R	R	R	
<b>BG-90-2</b>	R	R	R	R	R	R	
<b>WAS-197-B</b>	R	R	R	R	R	R	
<b>WAAPP-L1</b>	R	S	S	R	R	R	
<b>WAS-203-B</b>	R	R	S	R	R	S	Différentielles
<b>SK-19-34</b>	S	S	R	R	R	S	
<b>NERICA L2</b>	R	S	S	R	R	S	
<b>SK-95-4</b>	S	R	S	R	S	S	
<b>KHAOGAEW</b>	S	S	S	S	R	S	
<b>08FAN-2</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>BH2</b>	S	S	S	S	S	S	Sensibles
<b>DJAMADJIGUI</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>DK1</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>DM16</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>GAMBIAKA KOKOUM</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>KOGONI 91-1</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>NERICA 4</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>NIONOCA (AD9246)</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>RC-8</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>SAHÉLIKA</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>SEBERANNG MR77</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>SK-7-8</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>SWETASOKÉ</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>WAS-49-B</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>WAS-62</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>WASSA</b>	S	S	S	S	S	S	
<b>WATT 310</b>	S	S	S	S	S	S	

Tableau 3: Profil de virulence des pathotypes de Xoc sur les neuf variétés testées pour la seconde fois. Les 38 isolats (28 nouveaux isolats, 9 isolés en 2003 et 2009 et une souche des philippines) se répartissent en 12 pathotypes, notés de P1 à P12 sur les 5 variétés différentielles (en rouge). Le potentiel génétique des variétés cultivées au Mali ne leur permet pas de contrôler la souche BLS 256 (correspondante au pathotypes P12) de la collection des Philippines. Chaque pathotype est caractérisé par son profil de virulence sur les 9 variétés et le nombre de souche qui en appartient est indiqué. L'efficacité des variétés à contrôler différents pathotypes est également affichée. R = résistant, longueur de lésion  $\leq 5$  mm et S = sensible, longueur de lésion  $> 5$  mm).

RICE LINES	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	R%	S%
<b>GIGANTE</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	100	0
<b>SK20-28</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	100	0
<b>BG90-2</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	91	9
<b>ADNY</b>	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	73	27
<b>WAAPPL1</b>	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	73	27
<b>WAS197-B</b>	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S	S	64	36
<b>WAS203-B</b>	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	55	45
<b>DJAMADJIGUI</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	100
<b>KITAAKE</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	100
<b>FREQUENCY</b>	32	16	11	13	3	5	5	5	3	3	3	3		

## Les Figures :

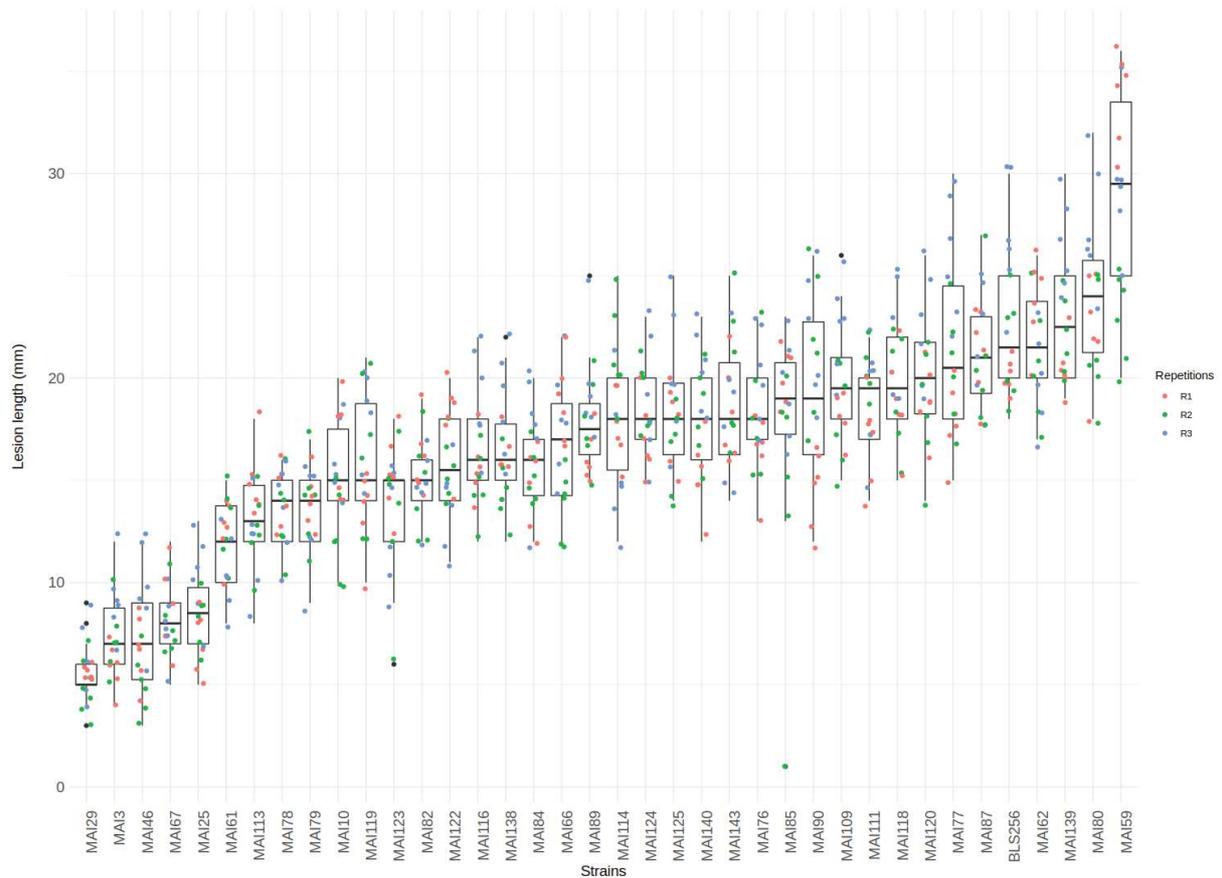


Figure 1: Virulence des 38 isolats de Xoc sur la variété sensible témoin Kitaake. Longueur de lésion globale par isolat. L'axe des X indique les souches Xoc testées. L'axe des ordonnées indique la longueur de la lésion en mm par souches 14 jours après l'infiltration. Les boîtes à l'intérieur sont des box plots des longueurs des lésions, les traits à l'intérieur indiquent les médianes. Les données de trois répétitions indépendantes de l'expérience avec chacune 6 valeurs de longueur de lésion par traitement (combinaison de Kitaake x isolats) ont été utilisées pour générer le graphique.

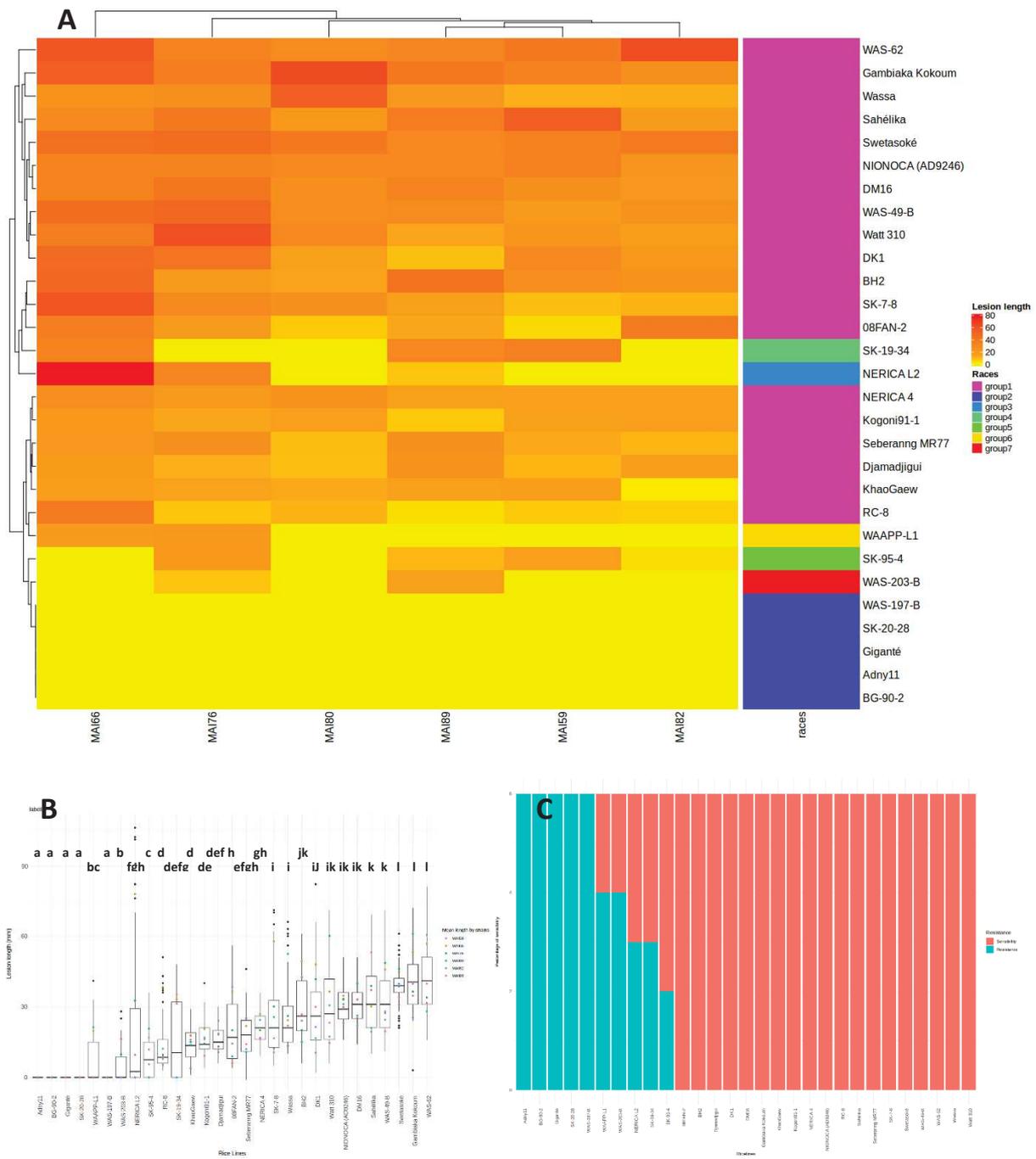


Figure 2: Réactions des 29 variétés de riz testées avec 6 souches de la collection Malienne de Xoc. (A) Efficacité d'un panel de 29 variétés de riz cultivées dans le contrôle de la strie foliaire au Mali. Sur le Heatmap, pour chaque interaction (variété x Xoc), les couleurs des cellules individuelles codent pour la longueur moyenne des lésions. Les clusters de variétés sont codés en couleur sur la barre colorée à droite suivant leur profil de résistance ou de sensibilité. Les isolats ont également été regroupés en fonction de leurs profils de virulence via l'arbre hiérarchique affichée au-dessus du Heatmap. (B et C) Niveau de résistance des variétés testées avec 6 isolats de Xoc. L'axe des X indique les variétés de riz testées. L'axe des Y indique la longueur des lésions observée en mm, 14 jours après l'inoculation par infiltration des feuilles (B) ou la fréquence des réactions de résistance / sensibilité des variétés (C). (B) Box plot des longueurs de lésions globales par variété. Les données affichées (boîtes à moustaches) correspondent à des longueurs de lésion de trois répétitions par traitement (combinaison variétés x isolats). Les longueurs de lésions moyennes avec la même lettre (a à l) ne sont pas significativement différentes (test de Bonferroni). C. Fréquence relative des réactions de résistance (R en bleu) ou de sensibilité (S en rose) des variétés contre les isolats maliens de Xoc. Les réactions avec une longueur moyenne de lésion  $\leq 1$  mm ont été considérées comme résistantes et  $> 1$  mm étaient considérées comme sensibles.

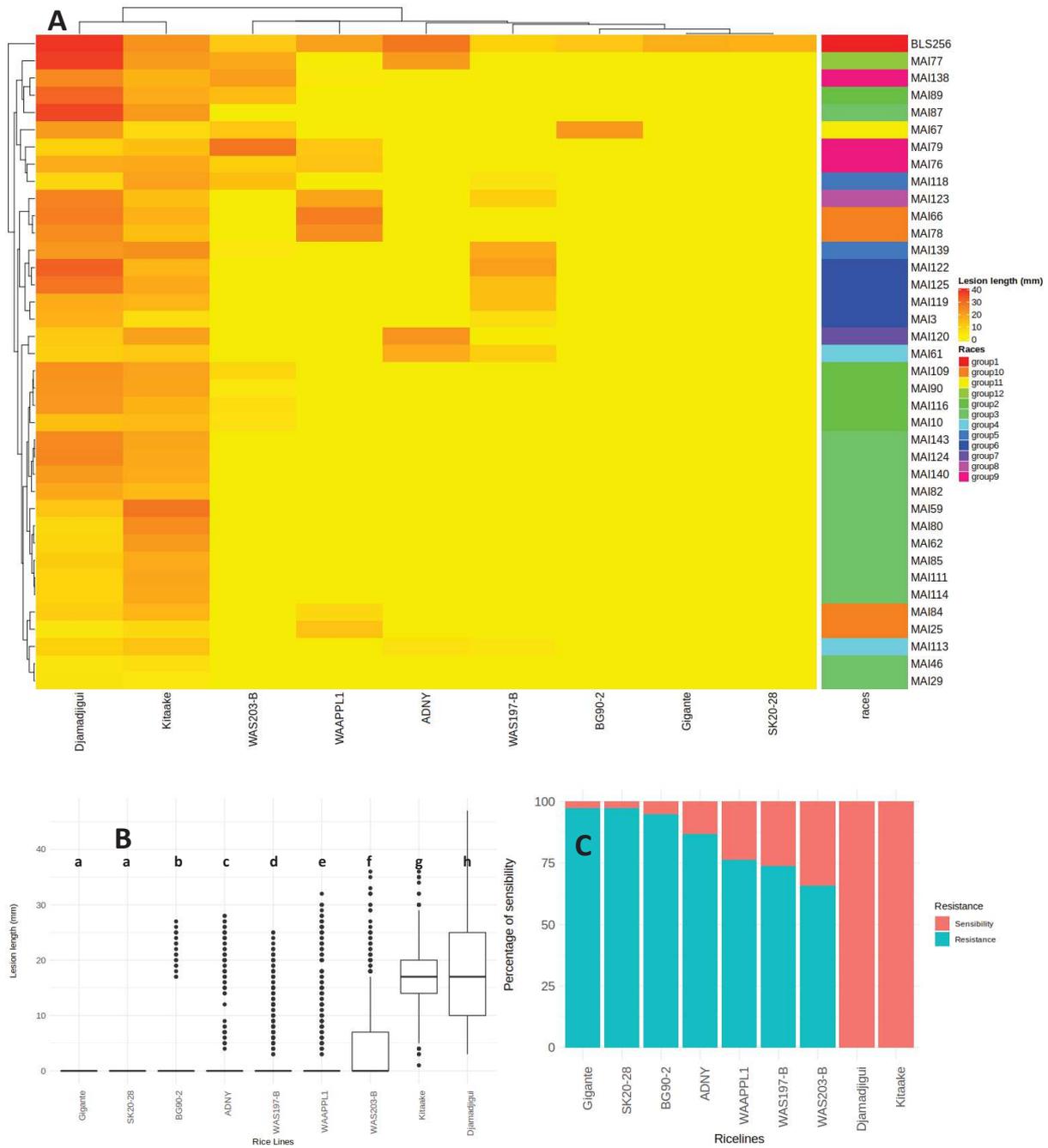
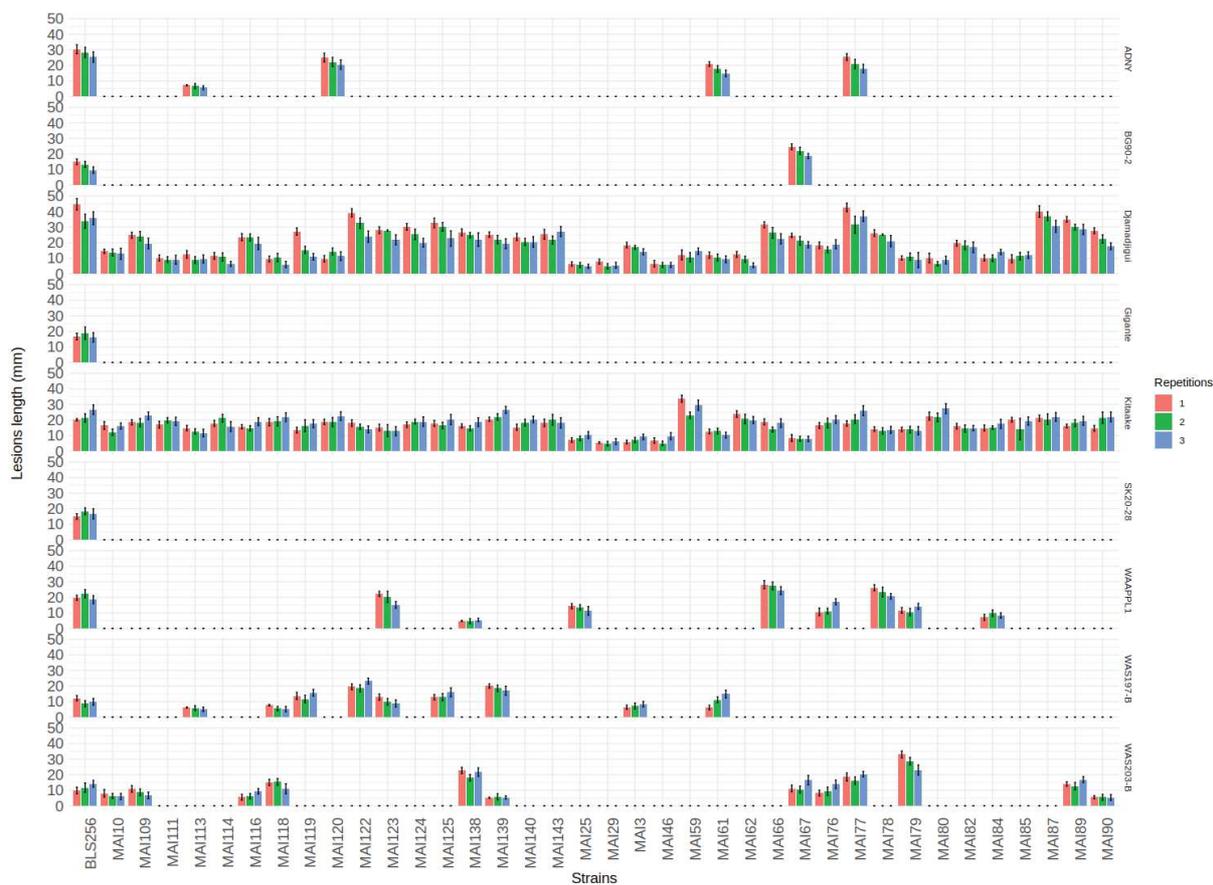


Figure 3: Identification des sources de résistance variétale du riz contre la strie foliaire au Mali. (A) Heatmap affichant les longueurs de lésions moyen pour chaque interaction (variétés x isolats). Les pathotypes ou l'ensemble des isolats partageant le même profil de virulence sur les 9 variétés testées (pour la seconde fois), sont codés en couleur dans la barre colorée à droite. Ces variétés ont été également classées en groupe, via l'arbre hiérarchique affiché au-dessus du heatmap, suivant leurs réactions de résistance ou de sensibilité aux inoculans. (B et C) L'axe des abscisses X indique les variétés de riz testées. L'axe des ordonnées Y indique les longueurs de lésion en mm observée 14 jours après l'inoculation par infiltration des feuilles (B) ou la fréquence des réactions de résistance (C) par variétés de riz. (B) Longueurs de lésion globales par variétés de riz. Les boîtes à moustaches affichées correspondent aux longueurs de lésion de trois expériences ou répétition indépendantes avec 6 valeurs par traitement (variétés x isolats) et par expérience. Les longueurs de lésion moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (test de Bonferroni). (C) Fréquences de réactions de résistance par variétés. Les longueurs de lésion  $\leq 1$ mm sont considérées comme résistantes (R en bleu) et  $> 1$  mm sensibles (S en rose).



Supplemental figure 1: Représentation globale des moyennes des longueurs de lésion des trois expériences ou répétitions indépendantes par isolat et par variété de riz. Chaque barre représente la moyenne des longueurs de lésion observées par isolat et par variété lors d'une répétition indépendante. L'écart-type de chaque moyenne est affiché au-dessus de la barre correspondante. L'axe des abscisses X indique les souches Xoc testées. L'axe des ordonnées indique les longueurs de lésion observées en mm par souches 14 jours après l'infiltration.

## Chapitre 4

Variation allélique de la résistance à large spectre et de la sensibilité aux *Xanthomonas oryzae* (*Xoo* et *Xoc*) au sein de la population de riz MAGIC

## Chapitre 4 : Variation allélique de la résistance à large spectre et de la sensibilité aux *Xanthomonas oryzae* (*Xoo* et *Xoc*) au sein de la population de riz MAGIC.

Article publié dans « *Journal of Plant Biotechnology* »

Bossa-Castro A, **Tekete C**, Raghavan C, Delorean E, Dereeper A, Dagno K, Koita O, Mosquera G, Leung H, Verdier V, Leach J. (2018). Allelic variation for broad-spectrum resistance and susceptibility to bacterial pathogens identified in a rice MAGIC population. *Plant Biotechnol J.* 16(9): 1559-1568. DOI:10.1111/pbi.12895

### Implication personnelle dans ce travail:

La présente étude a été réalisée en étroite collaboration avec l'équipe du Dr Jan Leach de Colorado State Université, initiée par V. Verdier avec le LBMA à l'Université de Bamako et l'IRRI. Cette collaboration visait à exploiter la population de riz MAGIC *indica* développée par l'IRRI et ses partenaires qui ont réalisé le génotypage des lignées MAGIC par GBS. L'équipe de CSU et de V. Verdier ont conduit l'ensemble du projet dont les travaux de criblage des lignées en serre et les analyses. Nous avons conduit le criblage des lignées avec les 16 souches représentatives des races de *Xoo* et des groupes de virulence des *Xoc* de la collection Malienne de *Xanthomonas oryzae* à Bamako (IER Sotuba) et avec l'appui de l'IER Sotuba. J'ai participé à la conception et à la réalisation du projet, j'ai été formé à l'analyse des données et ai participé à la rédaction du papier et présentations des résultats sous différentes formes.

### 1. Contexte:

Le flétrissement bactérien (BB) et la strie foliaire (BLS), causées respectivement par *Xanthomonas oryzae* *pv. oryzae* (*Xoo*) et *pv. oryzicola* (*Xoc*), constituent deux maladies importantes du riz au Mali. La plupart des variétés cultivées dans les grands centres d'intensification de la riziculture, sont sensibles aux deux maladies (Sarra et al 2010). Les second et troisième chapitres de ma thèse ont été consacrés à l'obtention et à la caractérisation d'une collection de souches de *Xoo* et *Xoc*. Comme décrites précédemment, ces analyses ont mis en évidence la description de 7 races de *Xoo*, (A3 à A9) avec la race A9, très virulente et contournant tous les gènes R de type *Xa* connus. Parmi les différentes variétés de riz testées pour leur résistance à *Xoo* et *Xoc*, Giganté et SK20-28, se sont révélées résistantes à toutes les souches testées. Les perspectives de recherche qui s'en suivent sont d'étudier le déterminisme génétique de la résistance de ces deux variétés. Cependant, sachant

que ces travaux s'inscrivent dans le cadre de ma thèse, et que l'approche conventionnelle pour identifier les gènes et QTL (Quantitative trait loci) de résistance s'inscrit sur un temps long, nous avons opté pour une méthode plus rapide et efficace. Nous avons exploité la diversité génétique et l'important taux de recombinaison d'une population de riz *indica* MAGIC (Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross), développée par l'IRRI et ses partenaires (Bandillo et al. 2013; Cavanagh et al. 2008; Raghavan et al. 2017). La combinaison de deux approches de cartographie, les études d'association pangénomiques (Genome-Wide Association Study, GWAS) et la cartographie par intervalle (Interval Mapping, IM), a permis de délimiter les régions génomiques associées à des QTLs de résistance à large spectre (ou BSR pour broad spectrum resistance) pour un contrôle des deux maladies (BB et BLS).

## 2. Matériels et Méthodes

La sélection et le développement d'une population de cartographie, riz MAGIC *indica*, à partir de huit parents, ont été précédemment décrits par Bandillo et al. (2013). Un total de 28 croisements biparentaux a été développé pour obtenir les individus de la génération F1. Les 28 F1 ont été intercroisés pour obtenir des graines portant chacune une recombinaison des caractères de 4 parents, lesquelles sont également intercroisées pour l'obtention des semences dotées des caractères combinés des huit parents initiaux. A ce stade, 35 croisements ont été réalisés sur 105 cas possible. Afin de fixer les caractères, ces graines (à 8 parents) ont été soumises à une série de multiplication successive par autofécondation. À la quatrième génération obtenue par autofécondation, un sous-ensemble (S4) de 200 AIL (advanced intercross lines) a été sélectionné au hasard pour le criblage (Bandillo et al. 2013). De même, un sous ensemble (S8) de 340 AIL, a été sélectionné à la sixième-huitième génération pour le criblage. En plus des parents, les sous-ensembles S4 et S8 ont été génotypés par séquençage (GBS) (Bandillo et al. 2013 ; Raghavan et al. 2017; Elshire et al. 2011). Le génome de référence Nipponbare a été utilisé pour l'étude des SNP (Glaubitz et al. 2014). 634 103 et de 396 361 marqueurs SNP ont été obtenus respectivement pour les sous-ensembles S4 et S8. Ces données initiales (S8) ont été filtrées à 14 475 marqueurs SNP, sur la base d'une fréquence allélique minimum (MAF) de 5%. Les lignées (parents, sous-ensembles S4 et S8, Nipponbare et WAB 56-125) ont d'abord été testées en serre à l'Université d'Etat du Colorado (CSU) pour leur résistance /sensibilité aux souches de *Xoo* et *Xoc*. Les lignées parentales et le sous ensemble S8 ont ensuite été testés en milieu réel dans les conditions agro écologiques du Mali (IER de Sotuba, Bamako). Les souches de référence du Mali (représentatives des races de *Xoo* et des groupes de virulence des *Xoc*), deux souches asiatiques et deux souches du Burkina-Faso ont été testées. Les souches Maliennes ont été testées en conditions semi-contrôlées à Bamako et CSU, les souches asiatiques et du Burkina ont été utilisées en conditions contrôlées à CSU. Les moyennes des longueurs de lésion (LL) observées (par lignée et par souche) et l'ensemble des marqueurs SNP (parents, S4 et S8) ont

été utilisés à la fois pour les analyses de GWAS et IM. Le logiciel TASSEL a été utilisé pour réaliser les analyses GWAS (Bradbury et al. 2007) en tenant compte de la matrice de l'apparentement (kinship matrix, K) suivant le modèle linéaire mixte (QMK, QM). La cartographie QTL a été réalisée en utilisant le package R mpMap suivant l'approche précédemment décrite (Huang et al. 2011). La prédiction de l'emplacement et l'annotation fonctionnelle des variantes (SNP) ont été réalisées à l'aide du logiciel SnpEff (Cingolani et al. 2012) suivant l'annotation du génome de référence MSU7 (Kawahara et al. 2013). Le logiciel Gevalt (Davidovich et al. 2007) a permis l'analyse du déséquilibre de liaison (LD) et de l'haplotype via l'application Web SNIPlay3 (Dereeper et al. 2015).

### 3. Principaux résultats:

Les sous-ensembles des populations S4 et S8 ont été utilisés pour cartographier les QTL associés à la résistance. Les parents ont présenté des réponses différentielles à chacune des 20 souches de *Xoo* et *Xoc*, suggérant l'existence de différentes sources de résistance contre *Xoo* et *Xoc*. Les réactions des lignées (AIL) aux souches de *Xoo* et *Xoc* observées en serre et en milieu réel, ont montré une large variation phénotypique par rapport aux parents des lignées avec des sources potentielles de résistance contre les agents causals du flétrissement bactérien (BB) et de la strie foliaire (BLS). De plus, une ségrégation transgressive de la sensibilité a été observée au sein des lignées AIL ce qui désigne cette population MAGIC *indica* comme étant propice à l'étude des loci associés à la sensibilité.

Les analyses GWAS réalisées en utilisant l'ensemble des marqueurs SNP et les données de virulence par souche et par sous-ensemble MAGIC, ont permis de mettre en évidence des régions QTL pour les quatre souches africaines de *Xoo* et *Xoc* testées sur la population S4 avec 42 SNP significatifs (valeur  $p < 0,001$ ) sur les chromosomes 4, 5, 8, 9 et 11. Un résultat similaire a été obtenu avec la population S8 avec 369 marqueurs SNP significatifs (valeur  $p < 0,001$ ) observés sur les chromosomes 2, 4, 5, 7, 10 et 11.

Ces QTL ont été également identifiés en utilisant une analyse de cartographie par intervalle. Un total de 19 QTL de résistance à *Xoo* et *Xoc* a été détecté au sein de la population S4 et les deux approches de cartographie, GWAS et IM, ont permis d'identifier des régions génétiques identiques sur les chromosomes. Par exemple, la région du chromosome 4 co-localise avec le locus *Xo1* efficace contre plusieurs souches des deux pathovars *Xoo* et *Xoc* (Triplett et al. 2016).

Les analyses IM sur la population S8 ont permis de mettre en évidence des associations significatives sur tous les chromosomes, à l'exception du chromosome 3, avec un total de 37 QTL spécifiques, et de nouvelles régions génomiques associées à la résistance au BB et BLS. Un plus grand nombre de régions associées ont été cartographiées par l'analyse IM que par celle du GWAS. En général, plusieurs QTL ont été détectés contre les deux maladies dans les

populations S4 et S8, et un grand nombre ont été confirmés à la fois par GWAS et IM. Cependant, pour de nombreux QTLs, la taille des intervalles observés avec la population S4 a été considérablement réduite en utilisant la population S8.

Les analyses de GWAS et IM sur le sous ensemble S8, ont permis d'identifier 14 QTLs de type BSR, parmi lesquels 11 (notés qXO) communs pour les deux pathovars *Xoo* et *Xoc*, et les trois autres notés qBLS et qBB, qui eux sont spécifiques à un seul des deux pathovars. Les plus prometteurs sont qXO-2-1, qXO-4-1 et qXO-11-2, qui confèrent potentiellement et respectivement une résistance à 12, 17 et 9 souches de *X. oryzae*. Des analyses de déséquilibre de liaison (LD) et d'haplotype ont confirmé la pertinence du choix de ces trois régions QTLs pour l'identification des gènes candidats contre BB et BLS, en identifiant respectivement 12, 9 et 8 blocs d'haplotype. De plus, l'association de plusieurs allèles à l'augmentation de la sensibilité (effet positif) a été observée chez qXO-2-1, qXO-4-2 et qBB-11-1.

**En conclusion**, plusieurs QTLs majeurs (11) de type BSR (résistance à large spectre) contre les souches de *Xoo* et *Xoc* (BB et BLS) ont été identifiés dans la population MAGIC indica. La combinaison des analyses GWAS ((Genome-Wide Association Study) et d'IM (Interval Mapping), est une approche précise de cartographie des QTL permettant une meilleure compréhension de leurs contributions à la résistance ou à la sensibilité vis-à-vis des souches de *Xoo* et *Xoc*.

#### 4. Perspectives:

La validation fonctionnelle des gènes candidats issus des trois régions QTLs qui semblent les plus prometteuses, qXO-2-1, qXO-4-1 et qXO-11-2 est en cours et fait l'objet d'une collaboration avec l'Université du Colorado et U. Cornell / IRD. La prise en compte de ces gènes candidats une fois identifiés et validés dans les programmes de sélection de résistance variétale pourra contribuer à améliorer la productivité du riz au Mali.

#### 5. Principales références bibliographiques

Bandillo N, et al. (2013) Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice* 6(1):1–15.

Bradbury PJ, et al. (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23(19):2633–2635.

Elshire RJ, et al. (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6(5).

Glaubitz JC, et al. (2014) TASSEL-GBS: A high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLOS ONE* 9(2):e90346.

Huang BE, George AW (2011) R/mpMap: a computational platform for the genetic analysis of multiparent recombinant inbred lines. *Bioinformatics* 27(5):727–729.

Cingolani P, et al. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly (Austin)* 6(2):80–92.

Kawahara Y, et al. (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6(1):4.

Davidovich O, Kimmel G, Shamir R (2007) GEVALT: An integrated software tool for genotype analysis. *BMC Bioinformatics* 8:36.

Dereeper A, et al. (2015) SNIPlay3: a web-based application for exploration and large scale analyses of genomic variations. *Nucleic Acids Res* 43(W1):W295–W300.

Raghavan C, et al. (2017) Approaches in characterizing genetic structure and mapping in a rice multiparental population. *G3 GenesGenomesGenetics* 7(6):1721–1730.

Sarra, S, L Diarra, M Dembele, M M Coulibaly, and Y Séré. 2010. “Characterization of Bacterial Leaf Blight Epidemic in the Office Du Niger (Mali) and Search for a Sustainable Resistance against the Pathogen,” July.

# Allelic variation for broad-spectrum resistance and susceptibility to bacterial pathogens identified in a rice MAGIC population

Ana M. Bossa-Castro<sup>1</sup>, Cheick Tekete<sup>2,3</sup>, Chitra Raghavan<sup>4,†</sup>, Emily E. Delorean<sup>1,‡</sup>, Alexis Dereeper<sup>2</sup>, Karim Dagnò<sup>5</sup>, Ousmane Koita<sup>3</sup> , Gloria Mosquera<sup>6</sup>, Hei Leung<sup>4</sup>, Valérie Verdier<sup>2</sup>  and Jan E. Leach<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Department of Bioagricultural Sciences and Pest Management, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA

<sup>2</sup>IRD, Cirad, IPME, Univ Montpellier, Montpellier, France

<sup>3</sup>Faculté des Sciences et Techniques, LBMA, Université des Sciences Techniques et Technologiques, Bamako, Mali

<sup>4</sup>Division of Plant Breeding, Genetics and Biotechnology, International Rice Research Institute, Manila, Philippines

<sup>5</sup>Plant Protection, Institute of Rural Economy, Sotuba, Mali

<sup>6</sup>Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia

Received 13 December 2017;

revised 22 January 2018;

accepted 26 January 2018.

\*Correspondence (Tel 970-491-2924;

fax 970-491-3862; email

Jan.Leach@colostate.edu )

<sup>†</sup>Present address: Horticulture and Forestry Sciences, Queensland Department of Agriculture and Fisheries, Cairns, QLD, Australia.

<sup>‡</sup>Present address: Department of Plant Pathology, Kansas State University, Manhattan, KS, USA

**Keywords:** broad-spectrum resistance, multiparent advanced generation intercross, *Xanthomonas oryzae*, Africa, bacterial leaf streak, bacterial blight.

## Summary

Quantitative trait loci (QTL) that confer broad-spectrum resistance (BSR), or resistance that is effective against multiple and diverse plant pathogens, have been elusive targets of crop breeding programmes. Multiparent advanced generation intercross (MAGIC) populations, with their diverse genetic composition and high levels of recombination, are potential resources for the identification of QTL for BSR. In this study, a rice MAGIC population was used to map QTL conferring BSR to two major rice diseases, bacterial leaf streak (BLS) and bacterial blight (BB), caused by *Xanthomonas oryzae* pathovars (pv.) *oryzicola* (Xoc) and *oryzae* (Xoo), respectively. Controlling these diseases is particularly important in sub-Saharan Africa, where no sources of BSR are currently available in deployed varieties. The MAGIC founders and lines were genotyped by sequencing and phenotyped in the greenhouse and field by inoculation with multiple strains of Xoc and Xoo. A combination of genomewide association studies (GWAS) and interval mapping analyses revealed 11 BSR QTL, effective against both diseases, and three pathovar-specific QTL. The most promising BSR QTL (qXO-2-1, qXO-4-1 and qXO-11-2) conferred resistance to more than nine Xoc and Xoo strains. GWAS detected 369 significant SNP markers with distinguishable phenotypic effects, allowing the identification of alleles conferring disease resistance and susceptibility. The BSR and susceptibility QTL will improve our understanding of the mechanisms of both resistance and susceptibility in the long term and will be immediately useful resources for rice breeding programmes.

## Introduction

Disease resistance in rice (*Oryza sativa* L.) is classified into two main categories, qualitative and quantitative. Qualitative resistance is controlled by a single resistance (*R*) gene and is usually effective against only certain strains of a pathogen species. As it imposes a greater selection pressure on pathogen evolution, this type of resistance can be more readily overcome. Conversely, quantitative resistance is conferred by quantitative trait loci (QTL), encompassing multiple genes, and is frequently associated with partial but durable resistance to an entire pathogen species or even different pathogen genera (Boyd *et al.*, 2013; Wisser *et al.*, 2005). Quantitative resistance is frequently referred to as broad-spectrum resistance (BSR), because of the breadth of pathogen groups it affects (Wisser *et al.*, 2005).

The deployment of disease resistance QTL in rice has been limited due to its complex genetic control and the lack of knowledge on the function of genes underlying the QTL (Ramalingam *et al.*, 2003). Recently, novel resources for association and interval mapping studies in rice, the multiparent

advanced generation intercross (MAGIC) populations, were developed and demonstrated to expedite identification of QTL (Bandillo *et al.*, 2013; Cavanagh *et al.*, 2008; Raghavan *et al.*, 2017). Each rice MAGIC population was generated from multiple founder lines, selected for their different agronomic traits and genetic background. The founders were crossed in a design that ensured an equal representation of each founder in the population. Benefits of MAGIC populations to QTL mapping are increased recombination, transgressive segregation events revealing novel phenotypes and capacity for fine mapping, which expedite the discovery of new resistance sources against pathogens (Bandillo *et al.*, 2013; Raghavan *et al.*, 2017).

Bacterial leaf streak (BLS) and bacterial blight (BB) are devastating diseases of rice that cause considerable losses and yield reductions, especially in Asia and Africa (Cernadas *et al.*, 2014; Mew *et al.*, 1992). In Africa, the expansion and intensification of crop cultivation, coupled with the absence of appropriate phytosanitary controls, have contributed to the increased incidence of BLS and BB and the emergence of more virulent pathogen strains (Verdier *et al.*, 2012; Wonni *et al.*, 2014). BB

has been an important threat in Africa since 1980, causing up to 50% yield loss, while BLS is a more recently observed disease, causing up to 20% yield loss (Kang *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 1979; Wonni *et al.*, 2015). In Asia, the use of resistant varieties is considered the most effective and sustainable way to control these diseases (Tang *et al.*, 2000; Verdier *et al.*, 2012), but sources of resistance for BLS and BB in Africa are lacking (Wonni *et al.*, 2015). BLS and BB are caused by two closely related pathogens, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), respectively. *Xoc* is a nonvascular pathogen that enters the plant through stomata or wounds and colonizes intercellular spaces of mesophyll parenchyma (Ou, 1985), while *Xoo* is a vascular pathogen that enters through hydathodes or wounds, causing a systemic infection (Tabei, 1977). Although African *Xoc* and *Xoo* strains elicit similar symptoms to their Asian counterparts, they display several genetic differences and are grouped into distinct phylogenetic clades (Gonzalez *et al.*, 2007; Wonni *et al.*, 2014).

Over 40 *R* genes against Asian *Xoo* strains have been mapped (Hutin *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015); however, most of these *R* genes are not effective in controlling the distinct strains of *Xoc* and *Xoo* present in sub-Saharan Africa (Gonzalez *et al.*, 2007). Djedatin *et al.* recently mapped disease resistance QTL effective against African *Xoo* strains, located on rice chromosomes 1, 7, 9, 10 and 11 (Djedatin *et al.*, 2016). Interestingly, the QTL on chromosome 11 confers resistance to both Asian and African *Xoo*. QTL for Asian *Xoc* have also been identified (Tang *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2014), but no QTL to African *Xoc* have yet been detected. Despite numerous efforts, only two resistance loci to *Xoc* are currently known in rice. These include the recessive resistance gene *bls1* effective against Asian *Xoc* (He *et al.*, 2012) and the locus *Xo1* effective against multiple African *Xoc* and *Xoo* strains (Triplett *et al.*, 2016). *Xo1* colocalizes with the *R* gene *Xa1*, which confers resistance to Asian *Xoo*, and work is in progress to determine whether they correspond to the same gene (Triplett *et al.*, 2016). Additionally, *Rxo1*, a gene cloned from maize, confers nonhost resistance in rice plants against *Xoc* (Zhao *et al.*, 2005). Previous studies argued that resistance to BLS is mostly quantitative (Tang *et al.*, 2000), possibly explaining why few single *R* loci have been detected so far (Makino *et al.*, 2006). As related pathogens, *Xoc* and *Xoo* use transcription activator-like (TAL) effectors as their primary virulence factors to manipulate rice gene expression and invade the host (Bogdanove and Voytas, 2011). Rice genes that promote infection, such as some genes activated by TAL effectors, are considered susceptibility (*S*) genes (Boch *et al.*, 2014). A disease resistance-associated region can have either the alleles that contribute to a resistant phenotype or the susceptible alleles that lead to increased disease. Because *S* gene activation is essential for *X. oryzae* virulence, the mutation of an *S* gene can decrease the ability to invade the host. The resulting resistance is therefore achieved by the loss of susceptibility (Boch *et al.*, 2014).

For this study, we selected a MAGIC population developed from eight indica founders (Table S1). Indica is one of the ecogeographical subspecies of rice grown widely cultivated in the tropics and the subtropics, including African countries (Garris *et al.*, 2005). Our goal was to use the indica MAGIC population to identify loci (QTL/genes) associated with resistance and susceptibility to BLS and BB of rice and, specifically, to identify loci that confer BSR to both diseases. Our primary focus was on strains of *Xoc* and *Xoo* from sub-Saharan Africa, due to the lack of effective BLS or BB resistance in currently cultivated germplasm

in this region (Verdier *et al.*, 2012). MAGIC indica founders had not been previously screened for resistance to African *Xoc* and *Xoo* strains. In general, BSR effective against multiple bacterial pathogens is a powerful resource for enhancement of local elite varieties or advanced lines from regional breeding programmes. Importantly, because highly useful new prebreeding materials can be extracted directly from MAGIC populations, this approach can significantly expedite the deployment of durable *X. oryzae*-resistant varieties.

## Results

### MAGIC indica population reveals sources of resistance to *Xoc* and *Xoo* strains

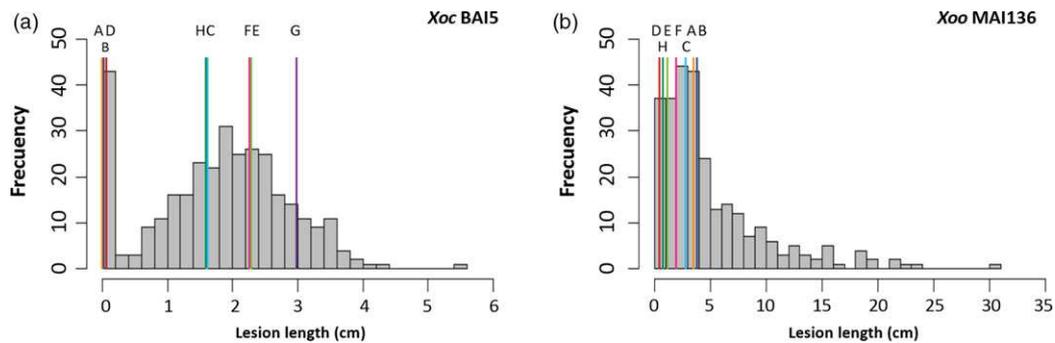
Two subsets of the MAGIC population were chosen at early (fourth, called S4) and advanced (sixth-eighth, called S8) selfed generations, consisting of 200 and 340 advanced intercross lines (AILs), respectively. Both subsets were used to map QTL/genes associated with resistance and susceptibility, and to evaluate the suitability of MAGIC populations for the discovery of disease resistance-associated regions. In addition, the resolution of QTL detection was compared for each generation (early and advanced).

The MAGIC S4 subset was screened with two *Xoc* and two *Xoo* African strains (Table S2). The responses to *Xoc* BAI5 and MAI3, and *Xoo* BAI3 and MAI1, measured as lesion length (LL), exhibited a large range of phenotypic variation when compared to the phenotypes of the founders (Figure S1). The phenotypic variation was expected, due to the high degree of recombination in this population. A high number of resistant AILs ( $0 < LL \leq 0.1$  cm for *Xoc* and  $0 < LL < 5$  cm for *Xoo*) were observed for strains *Xoc* BA5 and MAI3, and *Xoo* MAI1, whereas *Xoo* BAI3 showed a more normal distribution of phenotypes. Overall, these results demonstrated potential sources of resistance for BLS and BB in the MAGIC indica population.

The MAGIC S8 subset was screened using a larger set of strains with diverse genetic backgrounds and isolated from different geographical regions. A total of 20 *X. oryzae* strains, nine *Xoc* and 11 *Xoo*, were used for screening the S8 AILs and founders in the greenhouse and under field conditions in Mali (Figures 1, S2 and S3; Table S2). Two common strains were used to phenotype the S4 and the S8 (*Xoc* BA5 and *Xoo* BAI3). Phenotypic responses to most strains in both the greenhouse and the field displayed a right-skewed distribution, while some showed an approximately normal distribution (Figures 1, S2 and S3). As observed in the S4 screenings, founders responded differently to each strain, indicating different resistance sources. For strains *Xoc* BLS256 and *Xoo* MAI133, transgressive segregation for resistance was observed in the S8, showing AILs with more resistant phenotypes than any of the founders. Interestingly, for all the strains tested, transgressive segregation for susceptibility was observed in the MAGIC AILs (Figures 1, S2 and S3), thus positioning the indica MAGIC as a valuable population for studying susceptibility-associated loci.

### Multiple disease resistance QTL identified in the MAGIC indica population

Founders and the S4 subset were genotyped using the genotyping-by-sequencing (GBS) method (Bandillo *et al.*, 2013; Elshire *et al.*, 2011), as were 1,316 MAGIC AILs of the S6:S8 generation (Raghavan *et al.*, 2017). For this study, monomorphic SNP markers were excluded, and therefore, the final data sets contained SNPs for which at least one of the parents was



**Figure 1** Distribution of lesion length (cm) of MAGIC indica founders and S8 subset. (a) Screening of 323 AILs in the greenhouse with *Xoc* BAI5. (b) Screening of 276 AILs in the field with *Xoo* MAI136. Histograms represent mean values of MAGIC lines. Mean lesion lengths of founders are indicated with vertical lines (A: IR4630-22-2-5-1-3; B: Fedearroz 50; C: IR77298-14-1-2-10; D: Shan-Huang Zhan-2; E: PSBRc82; F: Sambha Mahsuri + Sub1; G: PSBRc158; H: IR45427-2B-2-2B-1-1). For *Xoo* MAI136, phenotypic value of founder PSBRc158 is missing due to lack of germination.

polymorphic. Genomewide association studies (GWAS) and interval mapping (IM) adapted to multiparent populations were conducted to detect genomewide associations and QTL, using the SNP marker data sets for each bacterial strain and MAGIC population subset (Table S3).

For GWAS, the founders were excluded, as this methodology considers individuals to be unrelated. The MAGIC indica population has a negligible population structure (Bandillo *et al.*, 2013; Mackay and Powell, 2007), allowing these studies. A kinship matrix was generated for each subset-bacterial strain data set, and then, analyses were performed using the mixed linear model (MLM) for S4 and S8 subsets. Regions associated with resistance to *Xoc* or *Xoo* were detected for all bacterial strains screened in the S4, with 42 significant SNPs ( $P$ -value  $< 0.001$ ), on chromosomes 4, 5, 8, 9 and 11 (Figures 2a, and S4a,c,e; Table S4). GWAS on the S8 yielded 369 SNP significant SNPs ( $P$ -value  $< 0.001$ ) and identified additional regions for resistance to *Xoc* or *Xoo* in all 12 chromosomes, with the most significant associations found on chromosomes 2, 4, 5, 7, 10 and 11 (Figures 2c,e, S5 and S6; Table S5). The GWAS approach detected two loci on chromosome 11, at 6–8 Mbp and 26–29 Mbp, for resistance to four *Xoo* strains (Figures 2e and S6a,e, k). The majority of the 369 significant SNPs were located in or near gene promoters (40), coding sequences (185), introns (43) and untranslated (28) regions (Table S5). The significance of the associations was notably higher in the S8 compared to the S4 for the same *X. oryzae* strain for three main reasons. The S8 is an advanced generation where alleles are fixed, as opposed to the S4 where alleles are still segregating, the number of the SNP markers used in the S8 was almost double that of the S4, and because a larger number of MAGIC AILs were screened in the S8 (Figures 2a,c, S4c and S6a).

For IM, genotypic and pedigree information from the AILs was used to generate a linkage map for each subset. QTL were determined using simple interval mapping, computing the founder effects between each pair of markers. A Wald test for the significance of all founder effects at each putative QTL position was performed. QTL were called when  $P$ -value  $< 0.001$ , and supporting intervals were calculated as the 95% confidence interval (1-LOD). A total of 19 disease resistance QTL were detected in the S4, located in almost all chromosomes, except 6 and 12 (Figures 2b, and S4b,d,f; Table S6). As expected, the two mapping approaches identified identical genetic regions; that is, IM supporting intervals contained markers significantly associated

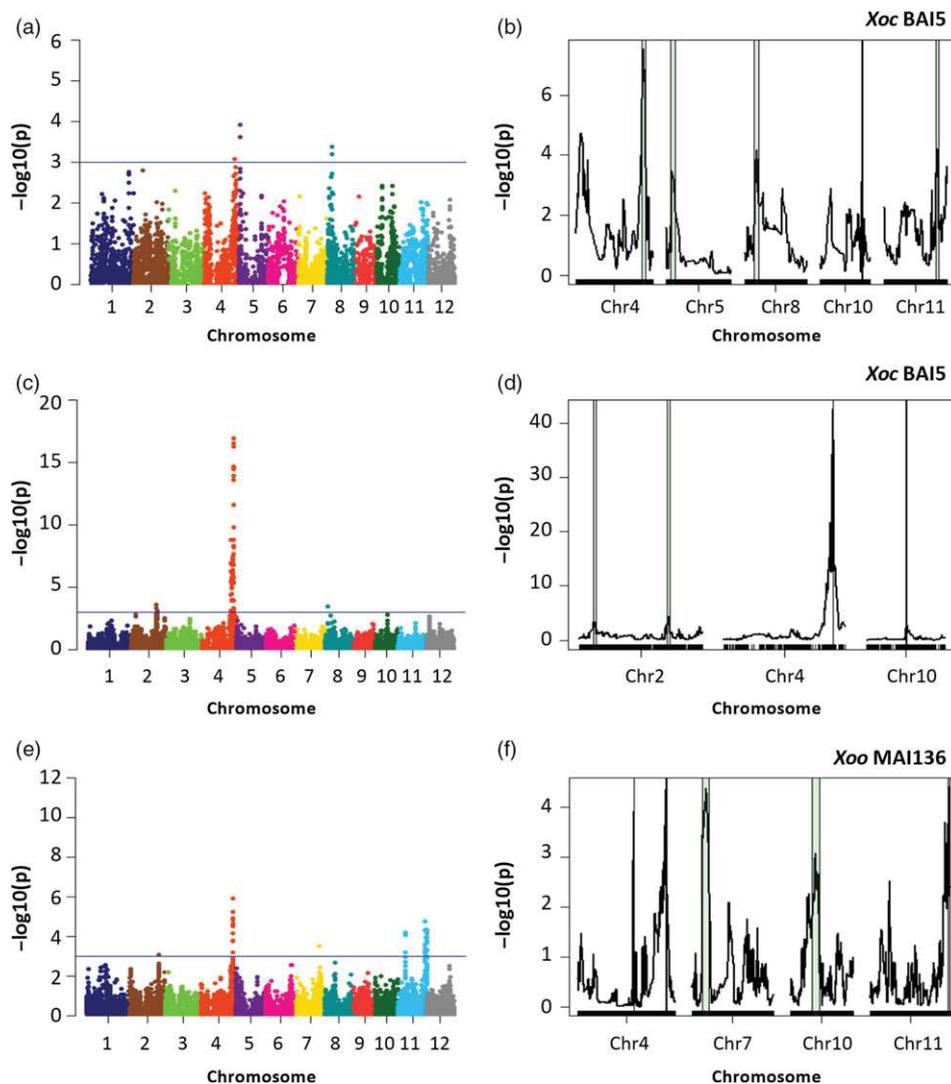
with GWAS in the S4 (Table S4). Overlapping genetic regions associated with disease resistance for both *X. oryzae* pathovars were mapped on chromosomes 4 for *Xoc* BAI5, MAI3 and *Xoo* BAI3, and on 11 for *Xoc* MAI3, and *Xoo* BAI3, at 30–32 Mbp and 27–29 Mbp, respectively (Table S6). The region on chromosome 4 colocalizes with a recently detected locus *Xo1* that is effective against multiple *Xoc* and *Xoo* strains (Triplett *et al.*, 2016), and the region on chromosome 11 was reported to contain resistance for *Xoo* but not for *Xoc* (Djedatin *et al.*, 2016).

Interval mapping analyses on the S8, performed independently for each strain and using 14 475 SNP markers, detected significant associations in all chromosomes except chromosome 3 (Figures 2b,d,f, S5 and S6; Table S7) and revealed novel genetic regions associated with resistance to BLS and BB. More associated regions were mapped using IM than GWAS for each strain, with up to three QTL within a single chromosome (Table S7). As observed in the S4, some identified loci were corroborated by the two approaches. A total of 37 strain-specific QTL were detected in the S8, with an average of five QTL per bacterial strain.

Overall, we identified multiple QTL associated with resistance to BLS and BB in both S4 and S8 subsets of the indica MAGIC population, many of which were confirmed by both GWAS and IM. While the earlier generation (S4) was sufficient to map regions associated with disease resistance, the S8 results yielded SNPs associated at lower  $P$ -values by GWAS and provided more precision for determining the location of the QTL by IM. In fact, the size of the supporting intervals detected in the S4 subset was notably reduced in the S8, for QTL on chromosomes 4, 5, 10 and 11 (Table S8).

#### MAGIC indica population uncovers multiple BSR QTL and allelic contributions to resistance and susceptibility

Integrating the results of GWAS and IM from the 20 *X. oryzae* strains in the S8, we identified 14 regions associated with resistance to multiple bacterial strains (Figure 3). Of these loci, 11 QTL, named qXO, are effective against both *Xoc* and *Xoo*, and three QTL, named qBLS and qBB, are specific to one pathovar. To define the limits of the pathovar-specific and BSR QTL, we selected the widest overlapping genetic region from IM analyses as the common QTL (Table 1 and Table S9). Most QTL were identified by both mapping approaches with the same pathogen strains, and some of these same QTL were detected by additional strains in GWAS. Four QTL were detected only by IM. Of the 369 significant SNPs yielded by GWAS across all strains, 103 SNPs



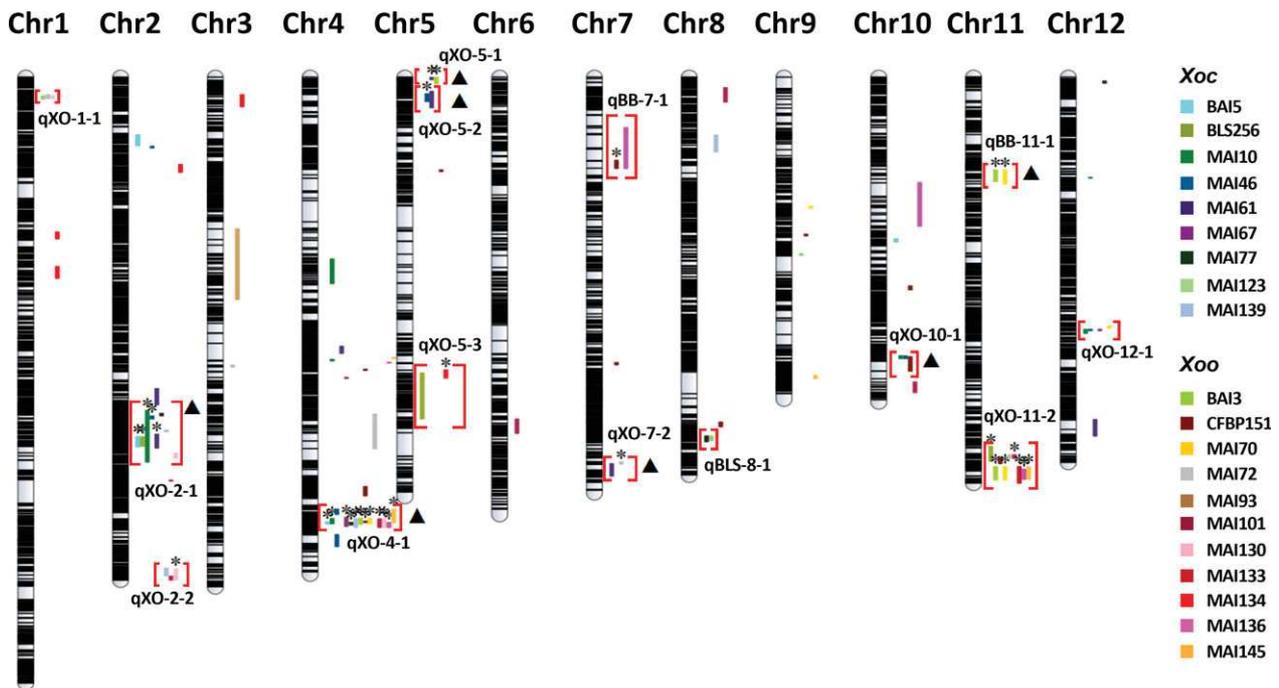
**Figure 2** Quantitative trait loci (QTL) detection for resistance to *Xoc* BAI5 and *Xoo* MAI136 in MAGIC indica S4 and S8 subsets. (a,b) *Xoc* BAI5 (markers = 7258), S4 subset. (c,d) *Xoc* BAI5 (markers = 14 475), S8 subset. (e,f) *Xoo* MAI136 (markers = 14 475), S8 subset. (a,c,e) Manhattan plots show the negative logarithm of the *P*-values for the mixed linear model, by chromosome. Solid blue line indicates significance threshold (*P*-value < 0.001). (b,d,f) Simple interval mapping showing chromosomes with significant QTL (*P*-value < 0.001). Green regions indicate 1-LOD support intervals.

were effective to multiple strains and located on QTL qXO-2-1, qXO-4-1, qXO-5-1, qBB-11-1 and qXO-11-2. Overall, we detected 51 QTL in the S8 (11 BSR QTL, three pathovar-specific and 37 strain-specific). From the 19 QTL detected in the S4, five overlapped with the BSR QTL qXO-2-2, qXO-4-1, qXO-5-2, qXO-10-1 and qXO-11-2 identified in the S8 (Table S6). The locations of QTL common to the S4 and S8 as well as the QTL sizes were refined in the S8, largely due to an increased number of SNPs, a larger sample size and the fact that the S8 is a more advanced generation where alleles are fixed (Table S8).

One advantage of performing both GWAS and IM, beyond confirmation of the identified QTL, is that clusters of significant SNPs within the QTL can be identified to fine map the causal genes. The most promising QTL in our study were qXO-2-1, qXO-4-1 and qXO-11-2, as they confer resistance to 12, 16 and nine *X. oryzae* strains, respectively. These QTL explained 6.3%–13.2%, 7.0%–39.5% and 6.9%–12.3% of the phenotypic variance to *X. oryzae* strains, respectively. Furthermore, for these three QTL, several SNPs were significantly associated with

multiple strains (Table S5). We selected the overlapping genetic region for each QTL where common SNPs were detected by different strains, 24.5–27.2 Mbp, 29.5–32.6 Mbp and 25.1–28.9 Mbp in chromosomes 2, 4 and 11, respectively. Linkage disequilibrium (LD) analyses performed within these regions identified haplotype blocks (Figures S7, S8 and S9). More than five SNPs significantly associated with resistance to multiple *X. oryzae* strains were clustered in a few haplotype blocks in each chromosome (Figures S7, S8 and S9; Tables S10, S11 and S12). These results provide useful information to narrow the genetic region associated with resistance for each one of these QTL. For instance, on chromosome 4, 26 of the 39 common significant SNPs were located in haplotype blocks 6, 7 and 8. SNPs on blocks 7 and 8 were associated with resistance to more than 15 strains (Figures 4a and S8; Table S11), and the putative donor of the resistant alleles in this region was the founder IR4630-22-2-5-1-3 (Table S11).

Integration of GWAS and IM in multiparent populations can help in assessing the phenotypic effects of single allelic variants at



**Figure 3** Integrative map showing resistance QTL to African and Asian *Xoc* and *Xoo* found in this study. Horizontal black lines represent the physical map using 14 475 SNP markers. Solid coloured lines next to chromosomes indicate supporting interval sizes for each strain-specific QTL detected (Table S7). *Xoc* and *Xoo* strains are differentiated by colours, as listed on the right. Red brackets highlight the 14 QTL that confer resistance to multiple *X. oryzae* strains. QTL names indicate whether it confers BSR, named qXO, or pathovar-specific resistance, named qBLS and qBB, for *Xoc* and *Xoo*, respectively. Stars (\*) above supporting intervals indicate QTL corroboration by GWAS; triangles (▲) indicate GWAS corroboration of the QTL by strains other than those in the IM.

each SNPs. All the SNP in the S4 and S8 subset are dimorphic; that is, there are only two possible alleles for each marker. GWAS estimate the effect of each allele at a SNP; in this case, a negative effect indicates the 'effect allele' is associated with shorter lesion lengths (thus associated with a more resistant phenotype) and a positive effect indicates the opposite. For the majority of the identified QTL, the effect (causal) alleles were predicted to have negative effects (Table S5). Interestingly, in qXO-2-1 and qXO-4-1, several alleles had positive effects, indicating their association with an increase in susceptibility. In qXO-4-1, 11 SNPs located in blocks 7 and 8 are associated with increased susceptibility to 12–15 *X. oryzae* strains (Figure 4b).

In summary, multiple BSR sources to *Xoc* and *Xoo* of particular importance to rice producing areas of sub-Saharan Africa were identified. Moreover, our integration of GWAS and IM results enabled refinement of the mapped QTL. By detecting phenotypic effects of causal alleles, we have identified resources that will facilitate a better understanding of how the affected genes contribute to resistance or susceptibility.

## Discussion

### MAGIC populations are powerful resources for discovery of novel, broad-spectrum disease resistance

In this study, we used an indica MAGIC population to identify QTL exhibiting broad-spectrum resistance to two bacterial diseases of rice, BLS and BB. Our results are particularly relevant for sub-Saharan Africa, given the increasing incidence of these diseases and the lack of resistance in currently used rice germplasm. In total, we identified 14 disease resistance QTL effective against multiple *X. oryzae* strains; of these, 11 are BSR QTL (Figure 3 and

Table 1). In addition, we identified 37 strain-specific QTL (Table S7). Of the total 51 QTL, 49 were confirmed under field screening conditions, supporting their value in the development of improved varieties.

Three types of novel resistance QTL for BLS and BB disease resistance were identified in this study, including 25 strain-specific QTL (Table S7), two pathovar-specific QTL (qBLS-8-1 for BLS and qBB-11-1 for BB) and three BSR QTL (qXO-1-1, qXO-5-2, XO-7-2). Although some of the identified BSR QTL colocalize with formerly described loci or QTL for Asian *X. oryzae* strains (e.g. qXO-2-1, qXO-2-2, qXO-5-1, qXO-5-3 and qXO-12-1), these regions were not shown previously to confer resistance to African *X. oryzae* strains. We used a larger and more diverse set of strains, including different *Xoo* races, and demonstrated a broader effectiveness for the previously identified loci qXO-4-1, qBB-7-1, qXO-10-1 and qXO-11-2 (Djedatin *et al.*, 2016; Triplett *et al.*, 2016). Two QTL, qXO-4-1 and qXO-11-2, coincide with clusters of *R* genes previously identified for Asian *Xoo* resistance on chromosome 4 (*Xa1*, *Xa2*, *Xa12*, *Xa14*, *Xa31* and *Xa38*) and chromosome 11 (*Xa3/26*, *Xa4*, *Xa10*, *Xa21*, *Xa22* and *Xa23*) (Kim *et al.*, 2015). *Xa4* and *xa5* are present in some of the MAGIC founders (Table S1). However, these *R* genes are only reported to confer resistance to *Xoo*, and thus, they do not confer BSR. The BSR QTL qXO-4-1 and qXO-11-2, together with qXO-2-1, confer resistance to a large number of *X. oryzae* strains and are excellent targets for further validation and use in crop improvement programs.

MAGIC populations include multiple founders, which endows greater genetic diversity, and their construction involves several crossing events, which increases shuffling of the progeny's genomes. For these reasons, a single MAGIC population can be

**Table 1** Quantitative trait loci (QTL) effective to multiple *X. oryzae* strains identified in this study

QTL	Chr	QTL position		Pathovar	No. of strains	Known resistance loci to	
		(cM)	Left Mrk			Right Mrk	African <i>X. oryzae</i>
qXO-1-1	1	5.2–5.9	S1_1335951	S1_1500023	both	3	
qXO-2-1	2	96.3–107.8	S2_24122049	S2_26993900	both	12	Qbr2a
qXO-2-2	2	141.1–142.9	S2_35289602	S2_35781025	both	3	AQBT001, qBbr2b, Xa24(t)
qXO-4-1	4	125.8–127.7	S4_31553264	S4_32064419	both	16	Xo1 AQBT008, Xa1, Xa2, Xa31(t), Xa38
qXO-5-1	5	0.1–1.3	S5_69530	S5_353165	both	3	qBLSr5a, qBbr5, xa5
qXO-5-2	5	5.9–8.0	S5_1494420	S5_2046183	both	4	
qXO-5-3	5	84.9–90.7	S5_21255253	S5_22750867	both	2	qBB-5-2, qBB5, qBB-5-2, AQW004, qBBR5
qBB-7-1	7	20.1–23.6	S7_5097414	S7_5993972	Xoo	2	qABB-7 xa8
qXO-7-2	7	109.9–112.3	S7_27578266	S7_28179129	both	3	
qBLS-8-1	8	102.6–102.7	S8_25638183	S8_25729831	Xoc	2	
qXO-10-1	10	79.6–80.8	S10_19975243	S10_20983368	both	5	qABB-10
qBB-11-1	11	28.0–28.9	S11_7012013	S11_7244498	Xoo	5	
qXO-11-2	11	107.5–114.6	S11_26879946	S11_28697227	both	9	qABB-11 QBbr11, AQBT023, Xa3/Xa26, Xa4, Xa22, Xa32(t), Xa35(t), Xa36(t), Xa40
qXO-12-1	12	70.7–71.8	S12_17786177	S12_18084420	both	4	AQBT029

Individual IM results (Table S7) were combined using the widest supporting interval shared by the different *X. oryzae* strains in overlapping genetic regions. Detailed information is shown in Table S9. Number of strains combines the total number of strains associated with each QTL by GWAS and IM analyses. Known resistance loci to African or Asian *X. oryzae* refer to previously identified QTL and single resistance genes (denoted by the prefix Xa or Xo).

used to study multiple traits and, as we observed in this study, can reveal more QTL than a single biparental population (Bohra, 2013). Multiparent populations also allow the possibility of using smaller sample sizes and earlier generations to identify traits of agricultural interest. We conducted QTL mapping in early and advanced generations, the S4 and S6:S8, respectively, and found that the former is suitable for coarse mapping while the latter allows for fine mapping (Cavanagh *et al.*, 2008), with reduced intervals, and confirmation of the associations found in the early generation (Table S8). Moreover, by combining GWAS and IM approaches, we identified alleles associated with resistance and susceptibility, which will help assess the mechanisms of resistance in these QTL.

### Understanding the resistance and susceptibility mechanisms to *X. oryzae* in rice

Despite advances in understanding how Asian *X. oryzae* elicit resistance or susceptibility in the host, the knowledge of resistance and susceptibility mechanisms to African *X. oryzae* is limited (Djedatin *et al.*, 2016; Triplett *et al.*, 2016). Both Xoc and Xoo contain and use TAL effectors for virulence, but their TAL repertoires are distinct (Cernadas *et al.*, 2014). Moreover, rice gene expression patterns during infection with Xoc and Xoo are very different (Cernadas *et al.*, 2014), suggesting that, in addition to differences in their tissue specificity, these pathogens differ in their virulence mechanisms. Rice *S* genes targeted by Xoo TAL effectors are different than those targeted by Xoc (Cai *et al.*, 2017; Verdier *et al.*, 2012). For instance, several Xoo TAL effectors target host sucrose transporter genes (Chen *et al.*, 2010), while some Xoc TAL effectors target sulphur transporter genes (Cernadas *et al.*, 2014).

Mutation of target *S* genes results in one type of host resistance, that is the loss of susceptibility (Boch *et al.*, 2014). These mutations can occur in promoters, blocking the ability of the TAL to bind and activate, or in coding regions, changing how effectors interact with the susceptibility target (Huang *et al.*, 2016). In our study, we found variants in promoters (40/369) and in coding regions (185/369) of potential *S* genes (Table S5). In the

near-term, these allelic variants can inform marker-assisted selection strategies for germplasm improvement. These specific alleles pinpoint gene candidates for functional analysis, the next step to revealing how the allelic variants contribute to resistance and susceptibility.

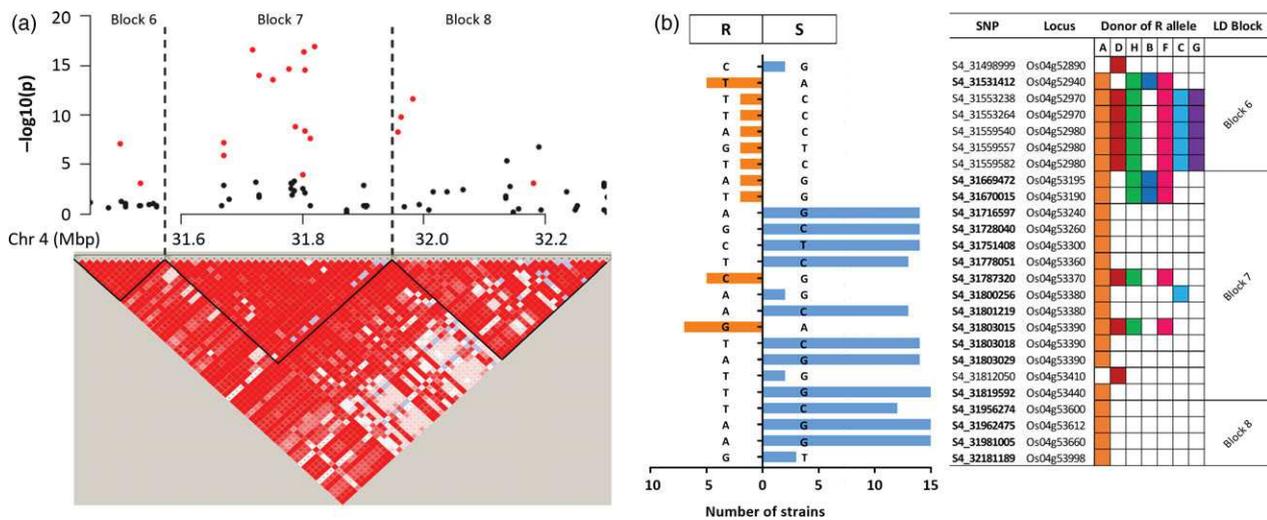
Remaining questions are (i) whether the same or different genes within each QTL are involved in the defence response to each of the *X. oryzae* pathovars, (ii) whether there are QTL interactions that favour the defence response and (iii) how the QTL are transcriptionally modulated.

Few resistance sources effective against diverse pathogens (broad-spectrum resistance, BSR) are available for crop improvement programs. BSR providing protection to two important rice diseases, bacterial blight and bacterial leaf streak, is particularly needed for African rice producing areas, where the resistance to both diseases is lacking. In this study, we identified 11 BSR QTL to BLS and BB diseases using a rice MAGIC indica population. The QTL were confirmed in greenhouse and field studies. Our work shows that the implementation of multiparent populations for the study of disease resistance, in combination with genomewide association and interval mapping analyses, can facilitate the discovery of BSR QTL. Moreover, the integration of these approaches is used to refine QTL and to improve the understanding of their contributions to resistance or susceptibility. Because the MAGIC founders are elite varieties, the disease resistance QTL identified here can be rapidly incorporated into breeding programmes to achieve more durable resistance to BLS and BB.

## Experimental procedures

### Plant materials

The crossing strategy and development of the MAGIC indica mapping population used in this study were previously described (Bandillo *et al.*, 2013). Briefly, the eight founders were intermated for a total of 28 biparental crosses. To derive 4-way



**Figure 4** Haplotype block analyses and SNP effects in a hot spot region for *X. oryzae* resistance within qXO-4-1. (a) Local Manhattan plot of *Xoc* BAI5 (top) and linkage disequilibrium (LD) with haplotype block analysis (bottom) of the 31.49–32.29 Mbp region on chromosome 4. Red filled circles indicate SNPs that are significant to multiple *X. oryzae* strains. LD heatmap shows the standard Haploview colour scheme to display LD with bright red for strong LD ( $LOD = 2 D' = 1$ ), pink ( $LOD = 2 D' < 1$ ) and blue ( $LOD < 2 D' = 1$ ) for intermediate LD, and white for no LD ( $LOD < 2, D' < 1$ ). (b) Summary of SNP effects to *X. oryzae* strains within haplotype blocks 6, 7 and 8 on chromosome 4. Size of the bars on the left denotes the number of strains for which a SNP was significant ( $P$ -value  $< 0.001$ ); colour and direction of the bars indicate the estimated effect, either negative (left, orange) or positive (right, blue). A negative effect is associated with a more resistant phenotype (R) and a positive effect with a more susceptible phenotype (S). For each SNP, the correspondent allele for the estimated effect is shown. SNPs in bold denote the SNP was significant in both pathovars (*Xoc* and *Xoo*), and otherwise, the SNP was significant only for *Xoc* strains. The locus ID for each SNP (prefix 'LOC\_' is omitted) was predicted from the MSU7 rice reference annotation. Founders are indicated with letters (A: IR4630-22-2-5-1-3; B: Fedearroz 50; C: IR77298-14-1-2-10; D: Shan-Huang Zhan-2; F: Sambha Mahsuri + Sub1; G: PSBRc158; H: IR45427-2B-2-2B-1-1). A coloured box on the donor column indicates that the founder carries the R allele.

crosses, the 28 F1s were then intercrossed, but only 70 crosses (of the possible 210 crosses) were performed. The 8-way crosses were derived from intercrossing the 70 4-way crosses, but only 35 (of the possible 105) 8-way crosses were performed. From each of the 35 8-way crosses, approximately 60 seeds were advanced by selfing, achieving a population size of approximately 2100 advanced intercross lines (AILs). At the fourth selfed generation, a subset of 200 AILs (S4 subset) was randomly selected for screening (Bandillo *et al.*, 2013). At the sixth–eighth selfed generation (S6:S8), 340 AILs were selected (approximately 10 random lines from 33 8-way crosses) for screening (called the S8 subset).

#### Genotyping and filtering of S4 and S8 subsets

Founders and the S4 subset were genotyped using a 96-plex ApeKI genotyping by sequencing (GBS) protocol (Bandillo *et al.*, 2013; Elshire *et al.*, 2011). The Nipponbare reference genome was used for SNP calling by the TASSEL GBS analysis pipeline v. 3.0.147 (Glaubitz *et al.*, 2014). The same procedure was repeated for the eight founders and 1316 MAGIC AILs of the S6:S8 generation (Raghavan *et al.*, 2017); SNP calling was carried out using TASSEL GBS analysis pipeline v. 3.0.169 (Glaubitz *et al.*, 2014).

Initial data sets of 634 103 and 396 361 SNP markers were obtained for the S4 and S8 subsets, respectively. Markers with missing calls, heterozygous and monomorphic markers in the founders were removed from both data sets. Missing calls were not imputed for any analysis. For the S4 subset, SNP markers for each AILs-bacterial strain data set were filtered so that 80% of the AILs had a call and a minimum frequency of 0.05 for the

minor allele, using TASSEL v 4.3.4 (Bradbury *et al.*, 2007). Resulting SNP markers for each strain are listed in Table S3. For the S8 subset, SNP markers were filtered so that 80% of the AILs had a call and a minimum frequency of 0.05 for the minor allele, resulting in a set of 14 475 SNP markers, using TASSEL v 5.0.2 (Bradbury *et al.*, 2007). The same SNP data sets for each bacterial strain in S4 and S8 subsets were used for both GWAS and IM (Table S3).

#### Greenhouse and field conditions

Plants screened in growth chamber and greenhouse were grown individually in pots containing 1 : 1 : 0.25 mixture of Pro-mix potting mix, peat moss and sand. Fertilizer (Peters Excel 15-5-15 Cal-Mag (Scotts) 300 mg/L) was applied twice per week, beginning at 2 weeks after germination.

The growth chamber conditions throughout the experiment were 16-h light/8-h dark at 28 °C day/24 °C night with an average relative humidity of 85% (used only for S4 screening of *Xoc* strains BAI5 and MAI3). The greenhouse conditions throughout the experiment were 16-h light/8-h dark at 30 °C day/25 °C night, with an average relative humidity of 75%.

The screening of MAGIC AILs in field conditions was conducted at the agronomic research station IER Sotuba (Bamako, Mali) from June to September 2015. Seeds were sown in pots filled with local compost. About 5 g of DAP (18-46-0) was added to each pot on the 15th, 25th and 35th days after sowing. The average temperature was 28 °C with a minimum of 23 °C and maximum of 33 °C. The total precipitation during this period was 680 mm with an average relative humidity of 74% (61% minimum to 88% maximum).

## Inoculations and phenotyping

Cultures of *Xoc* and *Xoo* were incubated for 24 h on peptone-sucrose agar (PSA) medium (Karganilla *et al.*, 1973) at 28 °C. For inoculum, the bacteria were suspended in sterile water at an optical density (OD 600) of 0.2 (10<sup>8</sup> CFU/mL).

For *Xoc* screenings, 4-week-old plants were inoculated by leaf infiltration, using a needleless syringe to introduce the bacterial suspension into the intercellular spaces of leaves (Reimers and Leach, 1991). One inoculation per leaf was performed in three leaves of the central tiller. Lesion lengths (in millimetres) were measured 12 days postinoculation (dpi), and 4 mm (the size of the infiltration site) was subtracted for each single measurement.

For *Xoo* screenings, 6-week-old plants were inoculated by the leaf clipping method (Kauffman *et al.*, 1973), cutting approximately 4 cm from the tip of the two fully expanded leaves of the central tiller with scissors dipped in bacterial suspensions. Lesion lengths (in centimetres) were measured 14 dpi.

## Experimental design

For the S4 subset, four technical replicates of each MAGIC line were independently screened with each bacterial strain. The averages of the lesion lengths were calculated for each line and used for GWAS and IM.

For greenhouse studies of the S8 subset, separate experiments were conducted for each bacterial strain (treatment; *Xoc* BAI5, BLS256 and *Xoo* BAI3), using a randomized block design with three replications (blocked over time). For each experiment, the S8 subset MAGIC AILs (340 lines), founders and controls (Nipponbare and WAB 56-125) were randomly planted. Least-squares means (LS means) were calculated for each MAGIC line, using Proc Mixed (SAS Institute 2008). A random model (with  $ddfm = kr$  for degrees of freedom) was used, where lesion length was the response variable, and line and rep were the independent and blocking variables, respectively. The LS means were used for GWAS and IM.

For the AILs screened in the field, six technical replicates of each MAGIC line were independently screened with each bacterial strain. The averages of the lesion lengths were calculated and for each MAGIC line and used for GWAS and IM.

## Genomewide association studies

GWAS were performed using TASSEL (Bradbury *et al.*, 2007). A kinship matrix (K) was generated for each SNP data set, and then, analyses were performed using the (Q + K) mixed linear model (MLM). To account for the false discovery rate, *q*-values were calculated using the *q*-value R package (Storey and Tibshirani, 2003). Manhattan plots were constructed using the qqman R package (Turner, 2014). For the S4 subset, TASSEL v 4.3.4 was used, and *P*-values < 0.001 were considered significant (Tables S3 and S4); for the S8 subset, TASSEL v 5.0.2 was used, and three levels of significance were considered (Tables S3 and S5): \**P*-value < 0.001 and *q*-value > 0.05; \*\**P*-value < 0.001 and *q*-value < 0.05; \*\*\**P*-value < 0.0001 and *q*-value < 0.05.

## Interval mapping analyses

The R package mpMap (Huang and George, 2011), a platform that allows QTL mapping for multiparent populations, was used as described previously (Huang and George, 2011). SNP data for each subset of AILs and founders, as well as pedigree information

of the AILs, were used to generate a linkage map (Raghavan *et al.*, 2017). QTL were determined using simple interval mapping from the *mpIM* function, computing the founder effects between each pair of markers. For the S4 subset, mpMap v 1.14 was used (Figure S3), whereas for the S8 subset, mpMap v 2.0.2 was used (Figures 3, S6 and S7). mpMap v 2.0.2 allowed the estimation of the percentage of phenotypic variation explained by each QTL.

## Prediction of SNP location and annotation

Functional annotation of variants was performed using SnpEff software (Cingolani *et al.*, 2012) using the MSU7 rice reference annotation (Kawahara *et al.*, 2013). Intergenic regions were defined as regions without predicted genes or located more than 1 kb upstream of genes.

## Linkage disequilibrium and haplotype analyses

Linkage disequilibrium (LD) and haplotype analyses were performed using Geval software (Davidovich *et al.*, 2007), through the SNIPlay3 web application (Dereeper *et al.*, 2015). Regions where multiple SNPs were significantly associated with resistance to several *X. oryzae* strains were defined on chromosomes 2, 4 and 11. The corresponding genotype data of the MAGIC population were then extracted and sent to Geval, which includes the visualization capabilities of Haploview (Barrett *et al.*, 2005), for the construction of the LD patterns and haplotype blocks.

## Acknowledgements

We thank Monsanto Beachell-Borlaug International Scholars Program for support of A.M.B.-C. and the International Foundation for Science for support of C.T., O.K. and K.D (IFS contract C/5650-1). V.V. was supported by a Marie Curie IOF Fellowship (EU Grant POF-GA-2009-235457). We thank J. Long, E. DuCharme and S. Vazquez for technical help. The authors declare no conflict of interest. We thank the Colorado State University Libraries Open Access Research and Scholarship Fund for support of publication costs.

## Author contributions

A.M.B.-C., C.R., O.K., G.M., H.L., V.V. and J.E.L. designed the research; A.M.B.-C., C.T., E.E.D., K.D. and V.V. performed the research; A.M.B.-C., C.R., A.D. and J.E.L. analysed the data; A.M.B.-C. and J.E.L. wrote the manuscript.

## References

- Bandillo, N., Raghavan, C., Muyco, P.A., Sevilla, M.A., Lobina, I.T., Dilla-Ermita, C.J., Tung, C.W. *et al.* (2013) Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice*, **6**, 11.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. and Daly, M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, **21**, 263–265.
- Boch, J., Bonas, U. and Lahaye, T. (2014) TAL effectors - pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytol.* **204**, 823–832.
- Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. (2011) TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, **333**, 1843–1846.
- Bohra, A. (2013) Emerging paradigms in genomics-based crop improvement. *Sci. World J.* **2013**, 585467.
- Boyd, L.A., Ridout, C., O'Sullivan, D.M., Leach, J.E. and Leung, H. (2013) Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends Genet.* **29**, 233–240.

- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E.S. (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, **23**, 2633–2635.
- Cai, L., Cao, Y., Xu, Z., Ma, W., Zakria, M., Zou, L., Cheng, Z. *et al.* (2017) A transcription activator-like effector Tal7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* activates rice gene *Os09g29100* to suppress rice immunity. *Sci. Rep.*, **7**, 5089.
- Cavanagh, C., Morell, M., Mackay, I. and Powell, W. (2008) From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 215–221.
- Cernadas, R.A., Doyle, E.L., Nino-Liu, D.O., Wilkins, K.E., Bancroft, T., Wang, L., Schmidt, C.L. *et al.* (2014) Code-assisted discovery of TAL effector targets in bacterial leaf streak of rice reveals contrast with bacterial blight and a novel susceptibility gene. *PLoS Pathog.* **10**, e1003972.
- Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J. *et al.* (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, **468**, 527–532.
- Cingolani, P., Platts, A., le Wang, L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S.J. *et al.* (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, **6**, 80–92.
- Davidovich, O., Kimmel, G. and Shamir, R. (2007) GEVALT: an integrated software tool for genotype analysis. *BMC Bioinformatics*, **8**, 36.
- Dereeper, A., Homa, F., Andres, G., Sempere, G., Sarah, G., Hueber, Y., Dufayard, J.F. *et al.* (2015) SnpEff: a web-based application for exploration and large scale analyses of genomic variations. *Nucleic Acids Res.* **43**, W295–W300.
- Djedatin, G., Ndjiondjop, M.N., Sanni, A., Lorieux, M., Verdier, V. and Ghesquiere, A. (2016) Identification of novel major and minor QTLs associated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (African strains) resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice*, **9**, 18.
- Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S. and Mitchell, S.E. (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, **6**, e19379.
- Garris, A.J., Tai, T.H., Coburn, J., Kresovich, S. and McCouch, S. (2005) Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, **169**, 1631–1638.
- Glaubitz, J.C., Casstevens, T.M., Lu, F., Harriman, J., Elshire, R.J., Sun, Q. and Buckler, E.S. (2014) TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS ONE*, **9**, e90346.
- Gonzalez, C., Szurek, B., Manceau, C., Mathieu, T., Sere, Y. and Verdier, V. (2007) Molecular and pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 534–546.
- He, W.-A., Huang, D.-H., Li, R.-B., Qiu, Y.-F., Song, J.-D., Yang, H.-N., Zheng, J.-X. *et al.* (2012) Identification of a resistance gene *bls1* to bacterial leaf streak in wild rice *Oryza rufipogon* Griff. *J. Integr. Agric.* **11**, 962–969.
- Huang, B.E. and George, A.W. (2011) R/mpMap: a computational platform for the genetic analysis of multiparent recombinant inbred lines. *Bioinformatics*, **27**, 727–729.
- Huang, S., Antony, G., Li, T., Liu, B., Obasa, K., Yang, B. and White, F.F. (2016) The broadly effective recessive resistance gene xa5 of rice is a virulence effector-dependent quantitative trait for bacterial blight. *Plant J.* **86**, 186–194.
- Hutin, M., Sabot, F., Ghesquiere, A., Koebnik, R. and Szurek, B. (2015) A knowledge-based molecular screen uncovers a broad-spectrum *OsSWEET14* resistance allele to bacterial blight from wild rice. *Plant J.* **84**, 694–703.
- Kang, M.J., Shim, J.K., Cho, M.S., Seol, Y.J., Hahn, J.H., Hwang, D.J. and Park, D.S. (2008) Specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in infected rice plant by use of PCR assay targeting a membrane fusion protein gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1492–1495.
- Karganilla, A., Paris-Natural, M. and Ou, S. (1973) A comparative study of culture media for *Xanthomonas oryzae*. *Philipp. Agric.* **57**, 141–152.
- Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh, S.P.Y. and Merca, S.D. (1973) An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Dis. Rep.* **57**, 537–541.
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J.P., Kanamori, H., McCombie, W.R., Ouyang, S., Schwartz, D.C. *et al.* (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, **6**, 4.
- Kim, S.M., Suh, J.P., Qin, Y., Noh, T.H., Reinke, R.F. and Jena, K.K. (2015) Identification and fine-mapping of a new resistance gene, *Xa40*, conferring resistance to bacterial blight races in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **128**, 1933–1943.
- Mackay, I. and Powell, W. (2007) Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends Plant Sci.* **12**, 57–63.
- Makino, S., Sugio, A., White, F. and Bogdanove, A.J. (2006) Inhibition of resistance gene-mediated defense in rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 240–249.
- Mew, T.W., Vera Cruz, C.M. and Medalla, E.S. (1992) Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in the Philippines. *Plant Dis.* **76**, 1029.
- Ou, S.H. (1985) *Rice diseases*. United Kingdom: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Raghavan, C., Mauleon, R., Lacorte, V., Jubay, M., Zaw, H., Bonifacio, J., Singh, R.K. *et al.* (2017) Approaches in characterizing genetic structure and mapping in a rice multiparental population. *G3: Genes - Genomes - Genetics*, **7**, 1721–1730.
- Ramalingam, J., Vera Cruz, C.M., Kukreja, K., Chittoor, J.M., Wu, J.L., Lee, S.W., Baraoidan, M. *et al.* (2003) Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 14–24.
- Reddy, A.P.K., MacKenzie, D.R., Rouse, D.I. and Rao, A.V. (1979) Relationship of bacterial leaf blight severity to grain yield of rice. *Phytopathology*, **69**, 967–969.
- Reimers, P.J. and Leach, J.E. (1991) Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene *Xa10* in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **38**, 39–55.
- Storey, J.D. and Tibshirani, R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 9440–9445.
- Tabei, H. (1977) Anatomical studies of rice plant affected with bacterial leaf blight, *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama Dowson). *Bull. Kyushu Agric. Exp. Sta.* **19**, 193–257.
- Tang, D., Wu, W., Li, W., Lu, H. and Worland, A.J. (2000) Mapping of QTLs conferring resistance to bacterial leaf streak in rice. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 286–291.
- Triplett, L.R., Cohen, S.P., Heffelfinger, C., Schmidt, C.L., Huerta, A.I., Tekete, C., Verdier, V. *et al.* (2016) A resistance locus in the American heirloom rice variety Carolina Gold Select is triggered by TAL effectors with diverse predicted targets and is effective against African strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant J.* **87**, 472–483.
- Turner, S.D. (2014) qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/005165>
- Verdier, V., Vera Cruz, C. and Leach, J.E. (2012) Controlling rice bacterial blight in Africa: needs and prospects. *J. Biotechnol.* **159**, 320–328.
- 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.
- Wonni, I., Cottyn, B., Detemmerman, L., Dao, S., Ouedraogo, L., Sarra, S., Tekete, C. *et al.* (2014) Analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* population in Mali and Burkina Faso reveals a high level of genetic and pathogenic diversity. *Phytopathology*, **104**, 520–531.
- Wonni, I., Djedatin, G. and Ouédraogo, L. (2015) Evaluation of rice germplasm against bacterial leaf streak disease reveals sources of resistance in African varieties. *J. Plant Pathol. Microbiol.* **6**, 1–5.
- Xie, X., Chen, Z., Cao, J., Guan, H., Lin, D., Li, C., Lan, T. *et al.* (2014) Toward the positional cloning of *qBlsr5a*, a QTL underlying resistance to bacterial leaf streak, using overlapping sub-CSSLs in rice. *PLoS ONE*, **9**, e95751.
- Zhao, B., Lin, X., Poland, J., Trick, H., Leach, J. and Hulbert, S. (2005) A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 15383–15388.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

**Figure S1** Distribution of lesion length (cm) of MAGIC indica founders and S4 subset.

**Figure S2** Distribution of lesion length (cm) of MAGIC indica founders and S8 subset screened with multiple Xoc strains.

**Figure S3** Distribution of lesion length (cm) of MAGIC indica founders and S8 subset screened with multiple Xoo strains.

**Figure S4** QTL detection for resistance to Xoc MAI3 and Xoo BAI3 and MAI1 in MAGIC indica S4 subset.

**Figure S5** QTL detection for resistance to Xoc strains in MAGIC indica S8 subset.

**Figure S6** QTL detection for resistance to Xoo strains in MAGIC indica S8 subset.

**Figure S7** Complete haplotype block analyses and SNP effects in a hotspot region for *X. oryzae* resistance on chromosome 2.

**Figure S8** Complete haplotype block analyses and SNP effects in a hotspot region for *X. oryzae* resistance on chromosome 4.

**Figure S9** Complete haplotype block analyses and SNP effects in a hotspot region for *X. oryzae* resistance on chromosome 11.

**Table S1** Agronomic traits of MAGIC indica founders (modified from (Bandillo *et al.*, 2013))

**Table S2** *Xanthomonas oryzae* strains used for inoculations.

**Table S3** SNP markers and MAGIC AILs used for GWAS and IM analyses in S4 and S8 subsets.

**Table S4** Significant SNPs in MAGIC indica S4 subset associated with disease resistance to African Xoc and Xoo, using MLM ( $P$ -value < 0.001).

**Table S5** Significant SNPs in MAGIC indica S8 subset associated with disease resistance to African and Asian Xoc and Xoo, using MLM ( $P$ -value < 0.001).

**Table S6** QTL detection for resistance to African Xoc and Xoo in MAGIC indica S4 subset ( $P$ -value < 0.001), organized by chromosome.

**Table S7** QTL detection for resistance to African and Asian Xoc and Xoo in MAGIC indica S8 subset ( $P$ -value < 0.001), organized by chromosome.

**Table S8** Comparison of QTL estimates for MAGIC indica S4 and S8 subsets for Xoc BAI5 and Xoo BAI3.

**Table S9** QTL effective to multiple *X. oryzae* strains found in this study.

**Table S10** Significantly associated SNP for resistance to multiple *X. oryzae* strains on chromosome 2, detected by GWAS in the MAGIC indica S8 subset.

**Table S11** Significantly associated SNP for resistance to multiple *X. oryzae* strains on chromosome 4, detected by GWAS in the MAGIC indica S8 subset.

**Table S12** Significantly associated SNP for resistance to multiple *X. oryzae* strains on chromosome 11, detected by GWAS in the MAGIC indica S8 subset.

## Chapitre 5

Identification des QTLs et gènes à large spectre de résistance contre le flétrissement bactérien et la strie foliaire dans 258 accessions de riz *indica* (projet 3K) et la variété SK20-28 par une analyse GWAS

## Chapitre 5 : Identification par GWAS de gènes à large spectre de résistance contre le flétrissement bactérien et la strie foliaire dans un panel de riz indica (projet 3K)

Tekete C<sup>1</sup>., Dereeper, A<sup>2</sup>., Cunnac, S<sup>2</sup>., Dembele, M<sup>3</sup>., Keita, I<sup>1</sup>., Sarra, S<sup>3</sup>., Karim, D<sup>3</sup>., Koita, O<sup>1</sup>., Verdier, V<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>University of Sciences, Techniques and Technologies of Bamako (USTT-B), Faculty of Science and Technology (FST), Applied Molecular Biology Lab (LBMA), Bamako, Mali

<sup>2</sup>IRD, CIRAD, Univ. Montpellier, IPME, Montpellier, France

<sup>3</sup>Institute of Rural Economy (IER), Regional Center for Agronomic Research (CRRA), Niono and Bamako, Mali

### Résumé

Déployer la résistance par l'utilisation de variétés élites semble être la stratégie la plus efficace pour contrôler le flétrissement bactérien (BB) et la strie foliaire (BLS), deux maladies majeures du riz, causées respectivement par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) et *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). L'identification des gènes de résistance est un prérequis essentiel pour tout programme de sélection variétale. L'utilisation des ressources génomiques et variétales développées dans le projet « 3000 génomes de riz séquencés » ou « 3K », nous a permis d'explorer le déterminisme génétique du riz *indica* pour la résistance à ces deux maladies. A partir de l'évaluation de la résistance d'un panel de 258 accessions représentatives du groupe 3K *indica* avec des souches représentant les différentes races de *Xoo* présentes au Mali et les différents pathotypes de *Xoc*, nous avons réalisé une analyse de génétique d'association à l'échelle du génome entier (Genome Wide Association Studies ou GWAS) permettant de confronter les données de phénotype de longueur de lésion avec les données de variations génomiques de type SNPs ou indels. Utilisant un modèle MLM permettant la correction des associations par la structure et l'apparentement (kinship) des accessions testées, un QTL à large spectre de résistance a été identifié dans la région comprise entre 31,47Mb et 31,90Mb du chromosome 4. L'analyse des marqueurs les plus significatifs de cette région QTL, notamment localisés dans les gènes Os04g53120 (indel en position 31637516 dans le promoteur) et LOC\_Os04g53160 (SNP non-synonyme en position 31662229) a révélé que ces deux gènes de type NBS-LRR étaient des candidats à la résistance très efficaces contre BB et BLS au Mali. L'alignement de ces deux gènes sur les génomes de la variété SK20-28 et ses deux parents, a révélé que la résistance de cette variété serait gouvernée par le gène Os04g53120 (*Xa1*) portant une délétion sur son promoteur. En combinaison avec 3 autres gènes NBS-LRR de la région (Os04g53050, Os04g53060, Os04g53496), l'analyse des haplotypes des marqueurs les plus significatifs a montré qu'ils sont fonctionnels en singleton et en clusters de 2, 3, 4 et 5 allèles de résistance dans les accessions testées. Une prédiction des allèles R candidats sur les 3 000 génomes a permis de faire la liste des accessions porteuses de ces gènes R candidats. Le criblage de ces accessions (obtenues de l'IRRI) pour leur résistance ou sensibilité aux souches de *Xoo* et *Xoc* confirmera ou pas notre hypothèse. Les accessions porteuses des cinq allèles R candidats sont à priori de potentiels donneurs pour la résistance et intéressantes à utiliser pour le transfert de ce caractère à d'autres variétés élites par sélection assistée par marqueur. Le déploiement de ces gènes permettrait un meilleur contrôle des souches de *Xoo* et *Xoc*.

**Mot clé:** GWAS, QTL, gène de résistance, flétrissement bactérien et strie foliaire

## 1. Introduction

Le riz (*Oryza sativa* L.) est l'aliment de base de la moitié de la population mondiale. C'est la céréale la plus importante au Mali et sa culture est assurée par plusieurs milliers de petits exploitants agricoles. Il a joué un rôle majeur dans la révolution verte dans les années 1960, une histoire bien connue de la sélection végétale moderne qui a largement contribué à la sécurité alimentaire mondiale (Li et al. 2014). La production de riz doit augmenter considérablement dans les années à venir pour suivre la croissance et la demande des populations. Cependant, sa productivité est en partie affectée par les bactéries phytopathogènes *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) respectivement responsables du flétrissement bactérien (BB) et de la strie foliaire du riz (BLS). Ces deux maladies du riz entraînent des pertes de rendement très importantes, en particulier en Asie et en Afrique (Cernadas et al. 2014), elles affectent la production de riz tant en zones pluviales qu'en zones irriguées. En Afrique, l'expansion et l'intensification de la culture, associées à l'absence de contrôles phytosanitaires appropriés, ont contribué à l'augmentation de l'incidence du BB et BLS et à l'émergence de souches d'agents pathogènes plus virulentes (Verdier et al. 2012; Wonni et al. 2014; Bossa-Castro et al. 2018). Pour induire la maladie sur le riz, *Xoo* et *Xoc* utilisent des protéines de virulence appartenant à la famille des effecteurs TAL qui régulent positivement l'expression des gènes cibles de la plante (Boch et Bonas 2010). L'activation de ces gènes est un facteur essentiel pour la virulence de *X. oryzae*, sa mutation pouvant diminuer la capacité de colonisation de *Xoo* dans l'hôte (Boch, Bonas et Lahaye 2014). En effet, dans une étude de polymorphisme des séquences cibles des effecteurs TAL impliquant 169 accessions de riz, un allèle du gène de sensibilité, OsSWEET14, a été trouvé dans certaines accessions de *O. barthii* portant une délétion de 18 pb associée aux sites de liaison ciblés par plusieurs effecteurs TAL. Cet allèle, appelé *xa41* (*t*), confère la résistance à une population *Xoo* de diverses lignées génétiques provenant de différentes régions géographiques (Hutin et al. 2015).

Pour contrôler le BB et le BLS, plusieurs approches ont été décrites (Busungu et al. 2018). L'utilisation d'une résistance variétale naturelle est une des stratégies la plus efficace, économique et respectueuse de l'environnement (Bossa-Castro et al. 2018; Verdier et al. 2012). L'identification des gènes de résistance est un préalable à tout programme d'amélioration variétal. Environ 44 gènes de résistance de type *Xa* (contre le BB) ont été décrits (Verdier et al. 2012, Busungu et al. 2018; Kim 2018; Kim et Reinke 2019). Ces gènes R ont été identifiés à la fois dans les cultivars de riz, les espèces sauvages apparentées, et dans certains cas après induction de mutations (Busungu et al. 2018). En effet, la plupart de ces gènes R ont été identifiés sur des accessions d'*Oryza sativa*, parmi lesquels une dizaine ont été cartographiés sur des génotypes *indica* et au moins 6 sur les donneurs *japonica*. Une dizaine proviennent d'accessions de riz sauvage (Hutin et al. 2015). À titre d'exemple, le gène à large spectre de résistance contre BB, *Xa38*, identifié sur *Oryza nivara* (IRGC 81825), contrôle les sept pathotypes *Xoo* du nord de l'Inde (Yugander et al. 2018). La résistance variétale pour

contrôler le BB du riz est donc considérée comme une approche respectueuse de l'environnement, et durable bien que les populations d'agents pathogènes évoluent dans le temps (Khan et al. 2014; Vera Cruz et al. 2000; Xia et al. 2012). En effet, bien que les souches africaines de *Xoo* et *Xoc* provoquent des symptômes similaires à celles d'Asie, elles présentent plusieurs différences génétiques et sont regroupées en clades phylogénétiques distincts (Bossa-Castro et al. 2018; Gonzalez et al. 2007; Wonni et al. 2014). En outre, la diversité pathotypique et génotypique des deux pathovars est assez élevée au sein de chacune des populations, africaines et asiatiques (Islam et al. 2016; Gonzalez et al. 2007; Triplett et al. 2014). Les principaux gènes de résistance connus ont été cartographiés avec précision sur le génome du riz et principalement pour le contrôle des souches asiatiques de *Xoo* et *Xoc* mais ils ne sont pas efficaces contre les souches *Xoo* et *Xoc* présentes en Afrique Subsaharienne (Chapitre 2, Gonzalez et al. 2007; Tekete et al. 2019). En effet, aucun de ces gènes majeurs clonés, pris isolément, ne contrôle efficacement les 7 races de *X. oryzae* pv. *oryzae* au Mali (Chapitre 2, Tekete et al. 2019). Il apparaît donc très important de continuer à tester les différentes populations de riz cultivé et sauvage afin de trouver les meilleures sources de résistance contre *Xoo* et *Xoc* et ainsi améliorer les gains génétiques dans la sélection variétale du riz. C'est la raison pour laquelle, nous avons testé les variétés de riz cultivées au Mali afin d'identifier les sources de résistance à large spectre aux souches de *Xoo* et *Xoc*.

Afin de caractériser la diversité génomique chez *O. Sativa* et de faciliter la recherche de nouveaux allèles associés aux caractères d'intérêt pour les sélectionneurs, l'IRRI et ses partenaires ont rassemblé l'une des plus grandes collections de riz au monde. Ils ont ensuite mis en place un méga projet de séquençage « The 3,000 rice genome project » de 3 000 accessions de riz provenant de 89 pays (Li et al., 2014). Suite à l'alignement sur le génome de riz référence MSU v7 (Kawahara et al., 2013) de la variété *japonica* Nipponbare, un total de 18,9 millions de polymorphismes nucléotidiques (SNP) répartis sur 12 chromosomes ont été identifiés (Li et al., 2014). Ces données des variants génétiques positionnés sur le génome de référence Nipponbare, qui bénéficie d'une solide annotation structurale et fonctionnelle, représente une ressource génomique exceptionnelle qu'il convient d'exploiter au mieux pour identifier des gènes impliqués dans la résistance ou la sensibilité à ces maladies.

Cette ressource génomique n'ayant pas encore été exploitée dans cette optique, nous proposons une étude approfondie permettant de confronter, par des approches GWAS notamment, les niveaux de résistance aux souches *Xoo* et *Xoc* de 258 variétés *indica* avec les informations alléliques de ces mêmes variétés issues du projet 3000 génomes. Plusieurs gènes de résistance aux souches asiatiques de *Xoo* ont été caractérisés sur le chromosome 4 (*Xa1*, *Xa2*, *Xa12*, *Xa14*, *Xa31* et *Xa38*) et sur le chromosome 11 (*Xa3 / 26*, *Xa4*, *Xa10*, *Xa21*, *Xa22*, *Xa23* et *Xa39*) (Chen et al. 2002; Das et al. 2014; Khan et al. 2014 ; Kim et al. 2015). En Afrique, cinq principaux loci de caractères quantitatifs (QTL) pour la résistance contre *Xoo* ont été caractérisés sur les chromosomes 1, 7, 9, 10 et 11. Le QTL observé sur le chromosome 7, contrôle la race A3 de *Xoo*, alors que celui du chromosome 11 est efficace contre toutes les races africaines testées, notamment la race A1 du Niger, les races A1 et A2 du Burkina-Faso et

la race A3 du Mali (Djedatin et al., 2016). Récemment, Bossa-Castro et al. (2018) ont également identifié deux QTL à large spectre de résistance contre *Xoo* et *Xoc* d'Afrique et d'Asie, notamment qXO-4-1 et qXO-11-2, respectivement sur les chromosomes 4 et 11. Par ailleurs, le gène récessif, *bls1*, est efficace contre les souches *Xoc* d'Asie (Wen-Ai et al. 2012) et le locus *Xo1* est efficace contre plusieurs souches africaines de *Xoo* et *Xoc* (Triplett et al. 2016).

Les analyses phylogénétiques basées sur les données SNP ont permis de classer les accessions 3K en 5 groupes variétaux, à savoir les *indica*, les *aus* / boro, les basmati / sadri, les *japonica* tropical et les *japonica* tempéré (Li et al., 2014) . Sachant que la plupart des variétés élites adoptées par nos paysans producteurs sont principalement du groupe *indica*, nous avons évalué le potentiel de résistance d'un panel de riz représentatif du groupe *indica* (3K) pour identifier des QTL et gènes à large spectre de résistance contre BB et BLS au Mali.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériels végétal

Les 3 000 accessions de riz (*O. sativa*) ont été collectées dans 89 pays et proviennent des cinq continents. Parmi celles-ci 2 466 accessions provenant de la collection de l'IRGC (International Rice Gene Bank Collection) et 534 accessions de la CNCGB (China National Crop Gene Bank). Cette collection de 3000 accessions a été constituée suivant les pays d'origine, selon l'adaptation des accessions aux écosystèmes et le type de variétés. Un panel de 288 accessions sur les 534 fournies par la CNCGB a été sélectionné selon leur diversité basée sur l'étude des isoenzymes (Li et al. 2014), leur utilisation dans les programmes internationaux de sélection variétale par marqueurs moléculaires. Une base de données a été développée à cet effet et permet d'accéder aux informations sur les accessions et à leurs séquences génétiques et génomiques.

De cette collection « 3K », nous avons sélectionné un panel de 258 accessions d'*indica* selon leurs origines géographiques avec au moins une à deux accessions par pays.

### 2.2. Dispositif expérimental et conditions de culture

Les essais de test de résistance (BB, BLS) ont été réalisés dans les conditions agro-écologiques des parcelles d'expérimentation agricole de la station IER (Institut d'Economie Rurale) de Sotuba, Bamako entre 2016 et 2017. Des plants âgés de deux semaines ont été transplantés dans des pots rectangulaires de 25l (BASSINE K4 nouveau Kim Mali) rempli de terreau naturel suivant le dispositif expérimental en split plot avec trois répétitions. Le terreau provenait de la décomposition naturelle de la matière organique de la forêt au niveau de la station de

recherche de Sotuba (Bamako, Mali). Ce terreau a été enrichi avec 25 g de fumier de volaille par pot. Les expériences ont été réalisées en période d'hivernage (saison des pluies) afin de bénéficier de l'effet de la forte teneur en humidité relative dont la valeur moyenne était de 75% pour un maximum de 89% et un minimum de 61%. La température moyenne était de 28,05°C, soit 22,96°C minimum et 33,15° maximum. Environ 3 g de l'engrais DAP (Diammonium Phosphate: 18-46-0) ont été utilisés 3 fois par pot, les 15ème, 25ème et 35ème jours après le semis.

### 2.3. Souches de *Xanthomonas oryzae* utilisées pour le criblage des 258 accessions d'*indica*

Une collection de souches de *Xoo* et *Xoc* a été mise en place et conservée à -80°C au LBMA et à l'IRD. Auparavant, ces souches *Xoo* ont été typées en 7 races et les *Xoc* en 11 pathotypes (chapitres 2 et 3). Nous avons sélectionné une douzaine de souches de *Xanthomonas oryzae* selon les races de *Xoo* et les pathotypes de *Xoc* afin d'évaluer la réaction de résistance ou de sensibilité des 258 accessions de riz issues des 3K et obtenues de l'IRRI.

Les souches de référence *Xoo* MAI1 et *Xoc* MAI10 (Gonzalez et al. 2007) ont été utilisées comme contrôles positifs et de l'eau distillée stérilisée comme contrôle négatif pour les inoculations sur les feuilles de riz. L'inoculum a été préparé avec de l'eau distillée stérile et des colonies bactériennes de *Xoo* ou *Xoc* à partir d'une culture de 24 heures sur PSA et incubée à 28°C. Les suspensions bactériennes ont été ajustées à une concentration finale de  $6.10^8$ CFU / ml à l'aide du spectrophotomètre Biophotometer 6131 (Eppendorf, Allemagne).

Pour les souches de *Xoc*, des plantes âgées d'un mois ont été inoculées par infiltration des feuilles en utilisant une seringue sans aiguille sous pression ce qui permet d'introduire la suspension bactérienne dans les espaces intercellulaires des feuilles (Reimers et Leach, 1991). Deux infiltrations ont été effectuées sur les deux dernières feuilles de chaque plante. Un total de 6 plantes a été inoculé par souche, soit 12 inoculations par souche et par accession. Les longueurs de lésion (en millimètres) ont été mesurées 12 jours après l'inoculation (dpi) et 4 mm (la taille du point d'infiltration) ont été soustraits de chaque mesure. Les plants dont les longueurs de lésions (LL) sont comprises entre 0 et 1 mm sont considérés comme résistants (R) et ceux sur lesquels les lésions dépassent les 1 mm sensibles (S) (Chapitre3).

Pour les souches de *Xoo*, des plantes âgées de 45 jours ont été inoculées par la méthode de coupure des feuilles (Kauffman et al. 1973) en coupant environ 3 cm de l'extrémité supérieure des feuilles avec une paire de ciseaux préalablement désinfectée et flambée à l'alcool puis trempée dans la suspension bactérienne. Un total de 6 plantes, soit 12 feuilles par accession de riz, a été également inoculé avec chaque souche de *Xoo*. Après l'inoculation, une couche d'eau de 5 cm d'épaisseur a été maintenue dans les bacs sous les plantes afin de maximiser l'humidité relative. Les observations ont été effectuées 15 jours après l'inoculation. Les longueurs de lésions (LL) ont été mesurées en centimètres (cm). Les lésions ont été classées suivant une échelle selon laquelle les plants montrants des lésions (LL) comprises entre 0 et 5

cm sont considérés comme résistants (R) et ceux pour lesquels les lésions dépassent 5 cm sensibles (S) (Chapitre 2).

#### 2.4. Données de séquençage et filtrage des variants génomiques :

Les 18,9 millions de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) découverts sur les 3000 génomes de riz du projet 3K, sur la base de l'alignement sur le génome de référence Nipponbare (MSU7), ont été filtrées à l'aide du logiciel RAVE (Rapid Allelic Variant Extractor) disponible sur la plate-forme RiceGalaxy (<http://galaxy.irri.org/>) (Juanillas et al. 2019). Le jeu de données de SNPs qui en résulte incluait 8,5 millions de positions polymorphes au sein du sous-ensemble de 258 accessions Indica sélectionnées. Une proportion importante d'appels manquants ainsi que de nombreux SNP hétérozygotes ont été observés. Sur la base d'un seuil de fréquence minimale à 5% (MAF=Minor Allele Frequency) pour supprimer les allèles rares et n'autorisant 0% de données manquantes dans la matrice de génotypage et que des sites-bi-alléliques, ces données ont été filtrées à l'aide du logiciel VCFtools (Danecek et al, 2011) pour obtenir un jeu de 202 520 SNPs. En parallèle, un deuxième jeu de données d'indels (insertion / délétion), découlant également du projet « 3000 rice genomes project », a été extrait selon les mêmes méthodes et critères. Les données SNPs et indels ont finalement été fusionnées pour constituer un premier jeu de données de variants génétiques basé sur la référence Nipponbare (MSU7). Celui-ci a été utilisé pour l'analyse de la structure de la population, puis pour générer la matrice d'apparentement (avec IBS centré par défaut) et réaliser l'analyse globale de GWAS. Il a été également utilisé pour générer l'arbre de distance selon la méthode Neighbor Joining.

#### 2.5. Analyse de structure de la population et analyse PCA

L'analyse de la structure de la population (Q) a été réalisée à l'aide du logiciel sNMF (Frichot et al, 2014), tandis que l'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à l'aide de PLINK (Cahng et al, 2015) via l'application Web SNIPlay (Dereeper et al, 2015). La colorisation des accessions selon les niveaux de résistance à *Xoo* a été faite suivant une échelle de phénotype basée sur un seuil de 5 cm selon lequel les accessions porteuses de lésions (LL) comprises entre 0 et 5 cm sont dites résistantes (R) tandis que les accessions ayant des lésions de plus de 5 cm sont sensibles (S).

## 2.6. Analyse de génétique d'associations à l'échelle du génome (GWAS)

Le GWAS a été réalisé pour détecter les associations entre les marqueurs SNP/indel et les phénotypes observés pour toutes les interactions entre les 258 accessions et les 18 souches de *Xanthomonas oryzae* testées. Cette analyse a été faite en utilisant la version 5.0.2 du logiciel TASSEL (Bradbury et al. 2007) et en tenant compte des 202 520 marqueurs des 258 accessions et leurs valeurs phénotypiques observées. Une matrice de l'apparentement (kinship K) a d'abord été générée pour l'ensemble de données SNP/indel et les analyses d'association ont ensuite été effectuées à l'aide du modèle linéaire mixte (MLM) Q+K. Des associations significatives entre les marqueurs et les phénotypes ont été observées sur la base d'un seuil de p-value de  $1 \times 10^{-7}$ . La pertinence du choix de ce seuil est renforcée par le Quantile-Quantile plot.

## 2.7. Prédiction de l'emplacement du SNP et de son annotation

Le logiciel SnpEff (Cingolani et al. 2012) a été utilisé pour annoter les variants SNP et indels positionnés sur le génome de référence Nipponbare et pour définir leurs emplacements dans les gènes (codant/non codant, synonyme/non-synonyme). Par ailleurs, les gènes reportés comme contenant des marqueurs significatifs ont également été annotés par les informations stockées dans la base de données daTALbase (Pérez-Quintero et al. 2017) afin de déterminer s'ils ont été identifiés comme étant exprimés de manière différentielle après l'inoculation des souches de *Xanthomonas*.

## 2.8. Analyse du déséquilibre de liaison et des haplotypes des QTLs

Les analyses de déséquilibre de liaison (LD) et des haplotypes ont été effectuées à l'aide du logiciel Gevalt (Davidovichet al. 2007), via l'application Web SNIPlay3 (Dereeper et al. 2015). Les régions portant plusieurs SNP significativement associées à la résistance contre la majorité des souches de *X. oryzae* ont été observées sur les chromosomes 2, 4 et 11. Les données génotypiques correspondantes à notre population ont ensuite été extraites et soumises à Gevalt, doté des capacités de visualisation de Haploview (Barrett et al. 2005), pour la construction des motifs LD et des blocs d'haplotypes. Par ailleurs, les détails des haplotypes basé sur le génome *indica* ont été obtenus avec GATK ReadBackedPhasing (McKenna et al, 2010) pour la reconstruction des haplotypes physiques à l'aide des informations de reads.

## 2.9. Prédiction des accessions porteuses des allèles R dans la base de données 3K

Les accessions parmi les 3000 génomes de riz séquencés portant les allèles associés à la résistance ont été identifiées à l'aide d'un script maison permettant d'extraire du fichier de génotypage global (format PLINK) les allèles des 5 premiers meilleurs marqueurs les plus significatifs.

## 2.10. Aperçu du contexte génomique des gènes R

Dans l'optique de disposer d'images illustrant l'environnement des gènes R candidats, nous avons utilisé l'instance Riz du genome browser *jbrowse* de South Green ([http://jbrowse.southgreen.fr/?data=oryza\\_sativa\\_japonica\\_v7](http://jbrowse.southgreen.fr/?data=oryza_sativa_japonica_v7)), qui regroupe de nombreuses pistes d'annotations, notamment les SNPs de la base de données 3K, les résultats du GWAS, les profondeurs de séquençage, les EBE des gènes cibles et les informations sur l'expression des gènes.

# 3. Résultats et discussion

## 3.1. Le panel d'accessions sélectionnées est représentatif du groupe *indica* de la collection 3K

Pour soutenir la recherche et l'amélioration variétale du riz au profit d'une meilleure alimentation humaine, l'IRRI et ses partenaires ont collecté et séquencé 3000 accessions de riz des cinq continents. L'analyse phylogénétique basée sur les données SNP ont permis de classer ces accessions en 5 groupes de variétés parmi lesquels, les *indica* constituent le plus important en effectif avec 1770 accessions (Li et al. 2014). Ce groupe d'accessions est également le plus répandu dans le monde, en Afrique et au Mali en particulier pour la production du riz. Cette importante distribution et utilisation des accessions *indica* reposent sur les caractères d'intérêt agronomique qu'elles hébergent dans leurs génomes. En guise d'exemple, plusieurs gènes de résistance contre BB et d'autres maladies telles que la pyriculariose et la panachure jaune du riz, ont été identifiés sur les lignées *indica*.

Dans le cadre de la recherche de solution contre l'émergence du BB et BLS, deux maladies du riz réduisant significativement les rendements, nous avons obtenu de l'IRRI, 258 accessions du groupe *indica* de la collection 3K, pour identifier les résistances à large spectre contre les populations maliennes de *Xoo* et *Xoc*. Sélectionnées sur la base des 89 pays d'origine, les 258 accessions constituent notre panel de base pour les analyses de la caractérisation de la

résistance. L'analyse en composantes principales (ACP) utilisant l'ensemble des 1770 accessions du groupe *indica* de la collection 3K et 112.971 SNP uniformément répartis sur les 12 chromosomes du riz a révélé que notre panel de base initial des 258 accessions est représentatif du groupe *indica* de la collection 3K. En effet, les 258 accessions de notre panel sont réparties de façon homogène sur la structure formée par les 1770 accessions *indica* (Figure 1A). Cette représentativité est confirmée par l'arbre de distance (Neighbor Joining) utilisant le même sous-ensemble SNP que l'analyse PCA (Figure 1B), suggérant que notre panel posséderait proportionnellement sur ses génomes, les caractères d'intérêts agronomiques du groupe *indica*, parmi lesquels, les allèles de résistance contre BB et BLS. La présente étude pourrait être une validation de cette hypothèse.

### 3.2. Le criblage des accessions *indica* révèle des sources à large spectre de résistance contre BB et BLS

Pour identifier les sources de résistance variétale contre BB et BLS au Mali, nous avons criblé les 258 accessions du panel avec les souches représentatives de la collection malienne de *Xoo* et *Xoc*. Les souches montrent différents niveaux de virulence sur les accessions différentielles et sensibles (Figure 2). La distribution de ces niveaux de virulence, matérialisés par les tailles de lésions, est consignée dans la Figure 2A et la représentation de l'ensemble des lésions causées par chacune des souches est illustrée dans la Figure 2B. Une analyse de dispersion basée sur ces données de virulence affiche une nette distinction entre les souches des deux pathovars de *Xoo* et *Xoc* (Figure 2C), marquant deux nuages de points relativement séparés dans le MDS (Multi-Dimensional Scale) plot. La diversité dans la virulence des souches de *X.oryzae* est observée également à l'intérieur de chaque groupe associé aux pathovars (Figure 2 C). Les *Xoc* MAI10 et MAI46 se sont largement distinguées des autres souches du même pathovar. La souche *Xoc* MAI63 est la souche la moins virulente sur les accessions testées.

Un nombre important d'accessions, avoisinant la moitié du panel testé, est résistant à l'ensemble des souches testées (Figure2D), suggérant l'existence de sources de résistance à large spectre et très efficaces contre les deux pathovars de *X.oryzae* au Mali. La figure 2D suggère l'existence de différents profils de résistance, certaines accessions sont sensibles à toutes les souches à la fois de *Xoc* et *Xoo*, certaines accessions ne contrôlent qu'un seul pathovar *Xoo* ou *Xoc*, tandis que d'autres répondent de manière différentielle aux souches d'un même pathovar (Figure2D). Nous avons observé des profils phénotypiques similaires lors du criblage des variétés cultivées au Mali avec les isolats de la collection Malienne des deux pathovars. Les variétés SK20-28 et Giganté montrent une source à large spectre de résistance contre les deux pathovars au Mali (Chapitres 2 et 3).

### 3.3. L'analyse GWAS révèle un QTL majeur sur le chromosome 4 des accessions *indica*, pour l'ensemble des souches de *Xanthomonas oryzae*

Les données SNP/indels des 258 accessions obtenues suite à l'alignement des reads sur le génome de référence Nipponbare (MSU7), ainsi que les données alléliques associées, ont été utilisées pour les différentes analyses sous-jacentes. Dans un premier temps, l'analyse de la structure de la population (Q) (Supplemental Figure 1.) montre qu'il existe une structuration génétique au sein de notre panel qu'il convient de considérer ultérieurement pour notre analyse GWAS. L'analyse en composantes principales (ACP) du même panel de 258 accessions basée sur 68 786 SNPs a confirmé cette structuration des accessions selon 2 à 5 groupes ancestraux. La valeur du nombre de populations doit être choisie selon le critère d'entropie croisée. La courbe d'entropie croisée montre une baisse quand on augmente le nombre de populations testées, avec un nombre minimal à  $K$  (kinship) = 5. (Supplemental Figure 1B). Pour cette raison, nous avons conservé la matrice d'admixture pour 5 populations qu'il conviendra d'appliquer pour la correction dans notre modèle de GWAS. En effet, il a été montré dans la littérature et admis que cela pouvait provoquer des faux positifs dans les études d'association si celles-ci n'étaient pas corrigées par la structuration génétique (Zhu et al. 2008). Cependant, la structuration ne semble pas impacter fortement ici les niveaux de résistance à *Xoo* si on projette les données de résistance. En effet, la colorisation des accessions *indica* basée sur une échelle de phénotype aux seuils de 5 cm pour *Xoo*, a révélé que le phénotype de résistance n'était pas ou peu associé à la structuration génétique (Supplemental Figure 1. C).

Pour surmonter les possibles associations de type faux positif, nous avons utilisé un modèle linéaire mixte (MLM) permettant une correction à la fois par l'apparentement ou kinship (K) et par la structure de populations (Q). En effet, une étape préalable de tests de différents modèles de GWAS, avec ou sans correction, a montré qu'il était plus approprié d'utiliser un modèle MLM avec une correction de type K+Q. La distribution des valeurs de p-(value) observées par rapport à l'attendu est observée sous la forme de quantile-quantile (Q-Q) plot (Supplemental Figure2). Ces graphiques révèlent que l'inflation des p-values n'est pas trop grande par rapport au modèle nul, suggérant que le modèle MLM K+Q est légèrement mieux adapté pour la cartographie d'association, considérant de notre jeu de données (Supplemental Figure2).

Pour identifier les régions génomiques associées aux phénotypes observés pour chaque souche de *Xanthomonas oryzae*, nous avons donc réalisé une série d'analyses GWAS sur les 258 accessions *indica* en utilisant le logiciel TASSEL, basé sur le modèle (MLM-K+Q), ce qui a révélé des associations significatives entre les marqueurs et les données de phénotype. Au seuil de p-value de  $1 \times 10^{-7}$ , les marqueurs associés à la résistance semblent se détacher des autres sur le Q-Q plot (Supplemental Figure2) et former un pic bien net sur les différents Manhattan plots réalisés pour chacune des souches (Figure 3 A). Ainsi, par l'approche GWAS, un QTL majeur, à large spectre de résistance contre toutes les souches *Xoo* et *Xoc* testées, a

été observé dans la région allant de 31,47Mb à 31,90Mb du chromosome 4. Son signal d'association atteint un niveau supérieur dans les analyses impliquant *Xoc* par rapport à *Xoo*, notamment pour MAI46 et MAI77 (Valeur p : 1.e-20). Bien que ce QTL soit présenté comme le signal principal et unique pour *Xoc*, d'autres sélections mineures et secondaires peuvent également être notifiées spécifiquement pour certaines souches de *Xoo*, comme sur le chr 8 pour MAI133, MAI145, MAI146.

En fixant le seuil de pvalue à 1e-07 pour qu'une association soit considérée comme significative, un total de 134 SNPs, soit respectivement 116 et 113 SNP pour *Xoo* et *Xoc* ont été détectés comme significatifs sur la région QTL majeure du chromosome 4.

Un QTL majeur a également été détecté dans cette région du chromosome 4 lorsqu'on a évalué la résistance des lignées MAGIC *indica*, obtenues par génotypage GBS, avec les souches africaines et asiatiques de *Xoo* et *Xoc* (Bossa-Castro et al. 2018). L'avantage de notre approche réside dans le fait qu'elle est basée sur des données de re-séquençage de génomes complets et non plus sur du GBS qui ne reflète que certaines régions du génome, avec une densité de marqueurs beaucoup plus forte ce qui procure une puissance et une finesse dans la détection de gènes candidats.

#### 3.4. Des marqueurs hautement significatifs, localisés dans les gènes de résistance, expliquent plus de 90% de la résistance

La région QTL du chromosome 4, identifiée comme hautement associée à la résistance à la fois à *Xoo* et *Xoc*, est riche en gènes de résistance de type NBS-LRR. Elle porte notamment les gènes de résistance *Xa1*, *Xa2*, *Xa31*, *Xa38* et *Xo1* (Bossa-Castro et al. 2018).

Plus précisément, les marqueurs les plus significatifs de cette région QTL sont localisés dans les gènes Os04g53120 (indel en position 31637728 dans le promoteur du gène), Os04g53160 (SNP non-synonyme en position 31662229) ou encore Os04g53170, gène adjacent au gène R précédent (Figure 3B), avec des valeurs de p (-values) allant jusqu'à 1.e<sup>-14</sup> et 1.e<sup>-21</sup> respectivement. Il est important de noter que ces marqueurs les plus significatifs sont le plus souvent des marqueurs retrouvés à l'état hétérozygote dans une forte proportion de variétés, notamment sur le gène Os04g53160 dont le niveau d'hétérozygotie est très fort. Cette hétérozygotie observée est sans doute une interprétation du fait de l'alignement de reads issus de régions hautement répétées, comme c'est souvent le cas dans les gènes de résistance. Si on catégorise les accessions en fonction de leur niveau de résistance, en utilisant les seuils de LL ≤ 5cm pour *Xoo*, LL ≤ 1mm pour *Xoc*, les accessions portant les allèles associés à la résistance pris indépendamment (marqueur par marqueur), présentent de 88% à 94% d'individus résistants.

La table 1 liste les cinq marqueurs les plus significatifs pour chacune des souches testées, avec une colorisation allant du rouge au vert selon le rang obtenu par classement de la valeur de p (value), par souche. On peut observer que les marqueurs les plus associés à la résistance à *Xoc* sont d'avantage localisés dans les gènes Os04g53160 et Os04g53170, tandis que ceux associés à la résistance à *Xoo* sont d'avantage localisés dans les gènes Os04g53160 et Os04g53120. Le gène Os04g53160, gène annoté NBS-LRR, apparait donc comme central dans la résistance à la fois à *Xoo* et *Xoc*, avec des marqueurs associés qui ne sont pas forcément identiques pour l'un ou l'autre des pathovars. Il est également important de noter que les marqueurs fortement associés ne sont pas neutres, d'une part parce qu'ils sont retrouvés justement au sein de gènes annotés comme gène de résistance, gènes de type NBS-LRR, et d'autre part parce qu'ils vont avoir des répercussions au niveau de la protéine codée par le gène. En effet, les marqueurs les plus forts sont situés dans les exons des gènes et sont annotés comme variants non-synonymes.

En figure 4, nous avons étudié l'effet combiné des différents marqueurs des gènes NBS-LRR de la région identifiée afin de voir si nous pouvions augmenter la part de résistance par haplotype. En combinant les marqueurs des gènes Os04g53160 et Os04g53120 avec 3 autres gènes NBS-LRR de la région, Os04g53050, Os04g53060, Os04g53496, l'analyse des haplotypes des marqueurs les plus significatifs (ou plutôt les combinaisons d'allèles) a montré que ces gènes agissaient efficacement en singleton et en clusters de 2, 3, 4 et 5 allèles de résistance dans les accessions testées. En effet, nous pouvons observer qu'en combinant 5 marqueurs des 5 gènes NBS-LRR de la région, nous pouvons obtenir jusqu'à 97% de résistance à *Xoo* et 94% à *Xoc* (Figure 4B). Cependant, il faut signaler que ces gènes n'expliquent pas totalement la résistance dans la mesure où de la résistance est observée au sein des accessions portant les allèles associés à la sensibilité, à hauteur de 3% pour *Xoc* et 23% pour *Xoo*. Cela suggère que d'autres voies de résistance co-existent en marge des gènes de résistance, comme il a été montré par l'inactivation des gènes de sensibilité par exemple. Enfin, si l'on cible spécifiquement quelques marqueurs de 3 gènes à combiner, Os04g53160, Os04g53120, Os04g53050 et Os04g53160, Os04g53060, Os04g53496 pour *Xoo* et *Xoc* respectivement (Figure 4C), on peut diminuer légèrement la résistance résiduelle dans les accessions ne portant pas l'allèle de résistance (à 13% et 2%) tout en conservant la forte part de résistance au sein des individus qui portent les allèles de résistance (même en l'augmentant dans le cas de *Xoc*, on passe à 96% pour *Xoc*).

Une prédiction des accessions portant les allèles R candidats parmi les 3 000 génomes a révélé leur très large distribution géographique sur les cinq continents. Pour valider ces gènes R candidats, les accessions qui en sont porteuses, ont été listées et obtenues suite à une requête auprès de l'IRRI. Le crible de ces accessions pour leur résistance /sensibilité contre BB et BLS confirmera ou pas la pertinence de leur sélection. Les accessions porteuses des cinq allèles R candidats sont de potentiels parents dans le cadre du transfert de la résistance à d'autres variétés élités par l'utilisation de la sélection assistée par marqueur. Le déploiement de ces

gènes permettra un meilleur contrôle de la population malienne de *Xoo* et *Xoc* et d'améliorer de manière significative la productivité du riz.

### 3.5. Focus sur les loci Os04g53120 et Os04g53160 très efficaces contre *Xoo* et *Xoc*

Les gènes Os04g53120 et Os04g53160 sont tous deux annotés comme gènes de résistance, gènes de type NBS-LRR. Le gène Os04g53120 a été annoté comme étant le gène *d'oryza japonica* Nipponbare correspondant au gène *Xa1*. Ceci étant le gène Os04g53160 montre une homologie très forte également avec *Xa1* et ce dernier qui semble jouer un rôle essentiel d'après nos résultats GWAS, a déjà été identifié comme étant différentiellement exprimé en présence de la bactérie *Xanthomonas*, plus précisément par analyse affymetrix suite à des inoculations de souches de *Xoo* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE34192>)

Les Boxplots présentés (Figure 3B) pour les 4 meilleurs marqueurs hautement significatifs, ont révélé qu'en dépit d'une forte association, les allèles associés à la résistance étaient le plus souvent retrouvés à l'état hétérozygote, notamment les 2 marqueurs clés du gène Os04g53160. L'allèle C associé à la résistance du marqueur SNP non-synonyme en position 31662229 du Os04g53160 se retrouve à l'état homozygote que sur 6 génotypes parmi les 258 accessions testées (donnant 100% de résistance) et semble conférer une résistance à l'état hétérozygote dans 88% des cas, laissant suggérer un caractère dominant. Suite à une extraction allélique dans les 3000 accessions du projet "3000 rice genomes project", l'allèle n'est porté à l'état homozygote que par 35 génotypes parmi les 1770 accessions indica du projet. De plus une forte hétérozygotie est observée tout au long du gène (Figure 5B).

Une des hypothèses permettant d'expliquer cette hétérozygotie observée au niveau des deux loci (Os04g53120, Os04g53160) très fortement associés à la résistance, serait la présence dans la sous-espèce *indica* de nombreuses copies de gènes similaires à *Xa1*, suffisamment proches pour être alignés en une seule région du génome de Nipponbare (correspondant à un seul ou deux modèles de gènes présent chez Nipponbare) et générant artificiellement des SNPs ( et donc des variations au sein du même individu) dans des zones qui correspondent en réalité à des gènes différents. C'est un phénomène couramment observé dans les gènes de résistance chez les plantes, provoquant ainsi un taux d'hétérozygotie anormalement élevé dans les régions répétées ou riches en éléments transposables. Les lectures de séquençage pourraient correspondre en réalité à différents copies de gènes de résistance répétées en tandem, mélangeant ainsi une forme active, efficace pour lutter contre la maladie et une forme inactive. Les individus résistants seraient porteurs des 2 formes à l'origine d'un mélange de séquences générant artificiellement des SNPs hétérozygotes, tandis que les individus sensibles ne porteraient que de la formes inactive.

Pour creuser cette hypothèse, nous avons procédé à l'analyse de profondeur le long de la région du QTL majeur du chromosome 4 (Figure 5). Le GWAS est alors repris uniquement avec les marqueurs du chr4.

L'analyse de la profondeur des reads a révélé des régions qui sont davantage couvertes, comparativement au reste du génome, dans les 2 gènes NBS-LRR: Os04g53120 (*Xa1*) et Os04g53160, ce qui pourrait suggérer une duplication en tandem de ces gènes (Figure 5 A B). Cela pourrait expliquer le niveau élevé de l'hétérozygotie dans les marqueurs significatifs 31662229 et 31661723 puisque les alignements ont été faits sur la référence Nipponbare (MSU7) du groupe japonica. Si l'on zoome précisément l'alignement des reads d'un individu résistant sur le gène Os04g53160 avec le logiciel Tablet, en amont du marqueur significatif SNP 31662229 on peut alors identifier et supposer les haplotypes locaux associés à la résistance ou à la susceptibilité (Figure 5 B C), reflétant le mélange de 2 types de séquences issus potentiellement de 2 gènes différents.

Pour élargir nos connaissances sur ces gènes de résistance, nous avons réalisé un alignement des reads directement sur le locus de résistance de l'accession japonica Carolina Gold Select récemment assemblée et publiée ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_004007595.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_004007595.1/)). L'analyse de la profondeur des reads sur le long du gène *Xa1* de deux accessions résistantes et de deux accessions sensibles (Figure 6A) révèle une région génique terminale fortement couverte chez les accessions résistantes et très faiblement couverte chez les accessions sensibles (Figure 6 A). Sur la base des 258 accessions de notre panel de base, l'analyse de la profondeur des reads sur la partie 3'terminale du gène *Xa1*, a révélé une différence significative du niveau de couverture dans la région 3', entre les accessions résistantes à *Xoc* et les accessions sensibles à *Xoc* (Figure 6B). L'analyse des domaines protéiques de *Xa1* indique que cette région absente chez les individus sensibles à *Xoc* correspond au domaine de la super famille des répétitions riches en leucine ou domaine LRR (leucine-rich repeat domain superfamily) dans la région N-terminal (Figure 6 C).

L'analyse des reads des accessions sensibles à *Xoo* sur la région promotrice du gène *Xa1* a révélé une insertion de C [TC/TC] par rapport à la référence (Figure 6 A). Cette insertion a généré à son tour une **forte prédiction d'EBE en amont du gène pour TAL E**, qui n'avait pas lieu sur la séquence de référence d'individu résistant (Figure 6 A), porteuse de la déletion de C [TC/T] associée à la résistance (Figure 3 B). Ce résultat suggère que la résistance à *Xoo* est TAL dépendante. Les accessions sensibles à *Xoo* et résistantes à *Xoc* (B028), ont une structure hybride avec l'insertion dans le promoteur permettant une fixation de TAL E (empêchant potentiellement la résistance à *Xoo*) et un domaine LRR bien couvert permettant la résistance à *Xoc* (Figure 6 A). Le variant du gène *Xa1* ainsi mis en évidence dans les accessions indica est très efficace contre les souches maliennes de *Xoo* via sa région promotrice (résistance dépendante des TALs) et contre les souches maliennes des deux pathovars, *Xoo* et *Xoc*, via son extrémité 3' terminale bien couverte. Il est possible que des phénomènes de recombinaison entre deux gènes soit à la base de la formation d'un gène hybride unique à l'origine de la résistance à *Xoo* et *Xoc*, intégrant à la fois la

délétion empêchant la fixation d'un TAL E dans le promoteur (et apportant ainsi une résistance à *Xoo*) et le domaine LRR complet (apportant une résistance à *Xoc* et *Xoo*).

Les analyses de prédiction d'EBE (Effector-Binding Element), via le logiciel Talvez, ont révélé que le gène Os04g53160, très efficace contre les deux pathovars, *Xoo* et *Xoc*, était également un cible des TALs, notamment, Tal B, Tal F et Tal H. Un indel provoque la perte de prédiction d'EBE pour Tal B et Tal H. Cependant, pour TalF, l'indel ne change pas la prédiction, il y a prédiction avec ou sans délétion.

### 3.6. Le gène Os04g53120 (*Xa1*) portant la délétion sur son promoteur avec une bonne couverture de son extrémité 3' terminale (domaine LRR) gouverne la résistance de SK20-28 et de Giganté

Les deux variétés, SK20-28 et son parent Giganté, sont très résistantes contre les souches des deux pathovars de *Xoo* et *Xoc* au Mali. Nous avons montré dans les chapitres 2 et 3, que SK20-28 et Giganté portaient la même source de résistance, et que la source de résistance a été transférée à SK20-28 à partir de Giganté (Chapitres 2 et 3).

Afin de caractériser le(s) gène(s) qui gouverne(nt) la résistance de SK20-28 contre BB et BLS, nous avons séquencé son génome en plus de ceux de ses deux parents de sélection (Croisement). Nous avons développé la carte physique des douze chromosomes de SK20-28 (Figure 7). Les trois variétés ont ensuite été incluses dans l'analyse GWAS des lignées MAGIC *indica* (Chapitre 4). Les gènes candidats ont ensuite été mappés sur les génomes des trois variétés. Aucune association n'a été observée, suggérant que ces allèles R candidats ne sont pas responsables de la résistance observée chez SK20-28.

Nous avons utilisé une seconde fois les trois variétés séquencées par nos soins dans les analyses GWAS de la présente étude. Nous avons ensuite mappé les allèles R candidats sur les trois génomes de SK20-28 et de ses deux parents. Il en résulte que SK20-28 et Gigante portent sur leur génome respectif, précisément dans la région QTL du chromosome 4, le gène Os04g53120 (*Xa1*) portant la délétion de C [TC/T] avec l'extrémité 3' terminale bien couverte (domaine LRR), suggérant que le variant du gène R, *Xa1*, avec la délétion sur son promoteur et un domaine LRR bien couvert serait responsable de la résistance de SK20-28 et de Gigante aux souches maliennes de *X. oryzae*. En effet, Giganté et SK20-28 ont en commun la région QTL du chromosome 4 (Figure 7).

Quand *Xa1* fonctionne dans le fonds génétique IRBB1 (IR24 *Xa18* + *Xa1*), il ne contrôle que 4 races de *Xoo* du Mali sur les 7 (Chapitre 2). Le variant de *Xa1* portant la délétion dans son promoteur et identifié chez SK20-28 et Gigante, contrôle les souches des deux pathovars de *Xoo* et *Xoc* au Mali. Ce qui nous permet de faire l'hypothèse selon laquelle la délétion du C et la bonne couverture du domaine LRR élargiraient le spectre de résistance de *Xa1*, rappelant les mécanismes d'action d'un gène cible des effecteurs TAL. En effet, la délétion du C est localisée dans l'EBE de Tal E et l'effet de l'indel fait baisser la prédiction de l'EBE, suggérant

que la délétion empêcherait la fixation de tal E sur le promoteur du gene. Ainsi, les trois races (A7, A8, A9) qui contournent la résistance d'IRBB1 (*Xa1*) (Chapitre 2), sont finalement détectées et contrôlées en présence de la délétion sur le promoteur et une bonne couverture du domaine LRR (extrémité 3' terminale) du gene. La délétion et la bonne couverture du domaine LRR auraient donc élargi le spectre de résistance du gene Os04g53120 (*Xa1*).

#### 4. Conclusions

La puissance des approches GWAS réalisées sur des données de re-séquençage de génomes complets d'un panel d'accessions indica, a permis, de caractériser un QTL majeur de résistance contre *Xoo* et *Xoc* sur le chromosome 4, et de mettre en évidence des marqueurs distincts dans le même QTL.

**En utilisant le genome de référence MSU v7 de Nipponbare**, les deux marqueurs les plus significatifs de cette région QTL (1. indel en position 31637728 dans le promoteur du gène 2. SNP non-synonyme en position 31662229) ont été localisés respectivement dans deux gènes NBS-LRR, Os04g53120 et Os04g53160 qui semblent être très efficaces contre *Xoo* et *Xoc*. Les trois autres loci de type NBS-LRR de la région QTL, Os04g53050, Os04g53060, Os04g53496 seraient impliqués dans la résistance aux deux pathovars mais pris individuellement, ils ne semblent pas avoir l'efficacité de Os04g53120 et Os04g53160. La forte hétérozygotie observée dans ces deux gènes candidats majeurs s'explique par la forte couverture des reads sur le long de ces gènes, suggérant une répétition en tandem de ces gènes NBS-LRR dans les accessions résistantes.

Pour élargir nos connaissances sur ces gènes de résistance, **en utilisant le genome de Carolina Gold comme référence**, l'analyse de profondeur des reads sur le long du gène *Xa1* (Os04g53120) a révélé deux caractéristiques essentielles, notamment, une délétion dans l'EBE de Tal E sur son promoteur et son extrémité 3' terminale (domaine LRR) est également bien couverte. Ces deux caractéristiques observées sur la région promotrice et l'extrémité 3' élargiraient le spectre de résistance de *Xa1* contre les deux pathovars au Mali. La présente étude a ainsi révélé deux gènes candidats de résistance très efficaces contre les deux pathovars, *Xoo* et *Xoc*, notamment un nouveau gène Os04g53160 et un variant de Os04g53120 (*Xa1*).

Ces gènes NBS-LRR candidats, seraient également des cibles des effecteurs TALs. Tal E ciblerait le gene Os04g53120 alors qu'Os04g53160, est ciblé par les effecteurs Tal B, Tal F et Tal H.

## 5. Références bibliographiques:

Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller, et M. J. Daly. 2005. « Haploview: Analysis and Visualization of LD and Haplotype Maps ». *Bioinformatics* 21 (2): 263-65. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>.

Boch, J, et U Bonas. 2010. « Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function ». *Annual Review of Phytopathology* 48 (1): 419-36. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>.

Bossa-Castro, A M., C Tekete, C Raghavan, E E. Delorean, A Dereeper, K Dagno, O Koita, et al. 2018. « Allelic variation for broad-spectrum resistance and susceptibility to bacterial pathogens identified in a rice MAGIC population ». *Plant Biotechnology Journal* 16 (9): 1559-68. <https://doi.org/10.1111/pbi.12895>.

Bradbury, P J., Z Zhang, D E. Kroon, T M. Casstevens, Y Ramdoss, et E S. Buckler. 2007. « TASSEL: Software for Association Mapping of Complex Traits in Diverse Samples ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (19): 2633-35. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>.

Busungu, C, S Taura, J I Sakagami, T Anai, et K Ichitani. 2018. « High-resolution mapping and characterization of xa42, a resistance gene against multiple Xanthomonas oryzae pv. oryzae races in rice (Oryza sativa L.) ». *Breeding Science* 68 (2): 188-99. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.17094>.

Cernadas, R A., E L. Doyle, D O. Niño-Liu, K E. Wilkins, T Bancroft, L Wang, C L. Schmidt, et al. 2014. « Code-Assisted Discovery of TAL Effector Targets in Bacterial Leaf Streak of Rice Reveals Contrast with Bacterial Blight and a Novel Susceptibility Gene ». *PLOS Pathogens* 10 (2): e1003972. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003972>.

Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ (2015) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets.

Cingolani, Pablo, Adrian Platts, Le Lily Wang, Melissa Coon, Tung Nguyen, Luan Wang, Susan J. Land, Xiangyi Lu, et Douglas M. Ruden. 2012. « A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff ». *Fly* 6 (2): 80-92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.

Danecek P, Adam Auton, Goncalo Abecasis, Cornelis A. Albers, Eric Banks, Mark A. DePristo, Robert Handsaker, Gerton Lunter, Gabor Marth, Stephen T. Sherry, Gilean McVean, Richard Durbin and 1000 Genomes Project Analysis Group, Bioinformatics, 2011The Variant Call Format and VCFtools,

Davidovich, Ofir, Gad Kimmel, et Ron Shamir. 2007. « GEVALT: An integrated software tool for genotype analysis ». *BMC Bioinformatics* 8 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-36>.

Djedatin, G, M-N Ndjiondjop, A Sanni, M Lorieux, V Verdier, et A Ghesquiere. 2016. « Identification of novel major and minor QTLs associated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (African strains) resistance in rice (*Oryza sativa* L.) ». *Rice* 9 (avril): 18. <https://doi.org/10.1186/s12284-016-0090-9>.

Du, Huilong, Ying Yu, Yanfei Ma, Qiang Gao, Yinghao Cao, Zhuo Chen, Bin Ma, et al. 2017. « Sequencing and de Novo Assembly of a near Complete Indica Rice Genome ». *Nature Communications* 8 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/ncomms15324>.

Gonzalez, C, B Szurek, C Manceau, T Mathieu, Y Séré, et V Verdier. 2007. « Molecular and Pathotypic Characterization of New *Xanthomonas oryzae* Strains from West Africa ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (5): 534-46. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0534>.

Hutin, Mathilde, François Sabot, Alain Ghesquière, Ralf Koebnik, et Boris Szurek. 2015. « A Knowledge-Based Molecular Screen Uncovers a Broad-Spectrum OsSWEET14 Resistance Allele to Bacterial Blight from Wild Rice ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 84 (4): 694-703. <https://doi.org/10.1111/tpj.13042>.

Islam, Md R, Md S Alam, A I Khan, I Hossain, L R. Adam, et F Daayf. 2016. « Analyses of genetic diversity of bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* using IS1112 in Bangladesh ». *Comptes Rendus Biologies* 339 (9): 399-407. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.06.002>.

Juanillas, Venice, Alexis Dereeper, Nicolas Beaume, Gaetan Droc, Joshua Dizon, John Robert Mendoza, Jon Peter Perdon, et al. 2019. « Rice Galaxy: An Open Resource for Plant Science ». *GigaScience* 8 (5). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz028>.

Kauffman, H. E., A. P. K. Reddy, S. P. Y. Hsieh, et S. D. Merca. 1973. « Improved Technique for Evaluating Resistance of Rice Varieties to *Xanthomonas Oryzae* ». *Plant Disease Reporter*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201303262926>.

Khan, Mueen, Muhammad Naeem, et Muhammad Iqbal. 2014. « Breeding approaches for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.), current status and future directions ». *European Journal of Plant Pathology* 139 (mai). <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0377-x>.

Kim, Suk-Man. 2018. « Identification of Novel Recessive Gene Xa44(t) Conferring Resistance to Bacterial Blight Races in Rice by QTL Linkage Analysis Using an SNP Chip ». *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 131 (12): 2733-43. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3187-2>.

Kim, Suk-Man, et Russell F. Reinke. 2019. « A Novel Resistance Gene for Bacterial Blight in Rice, Xa43(t) Identified by GWAS, Confirmed by QTL Mapping Using a Bi-Parental Population ». *PLOS ONE* 14 (2): e0211775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211775>.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools, *Bioinformatics* (2009) 25(16) 2078-9

Li, Zhikang, Gengyun Zhang, Kenneth L. McNally, Nickolai N. Alexandrov, Ramil P. Mauleon, Hei Leung, et Jauhar Ali. 2014. « The 3,000 rice genomes project ». *GigaScience* 3 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-3-7>.

McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20:1297–1303.

Pérez-Quintero, Alvaro L., Léo Lamy, Carlos A. Zarate, Sébastien Cunnac, Erin Doyle, Adam Bogdanove, Boris Szurek, et Alexis Dereeper. 2017. « daTALbase: A Database for Genomic and Transcriptomic Data Related to TAL Effectors ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31 (4): 471-80. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0153-FI>.

Triplett, Lindsay, Ralf Koebnik, Valerie Verdier, et Jan E. Leach. 2014. « The Genomics of *Xanthomonas Oryzae* ». In *Genomics of Plant-Associated Bacteria*, édité par Dennis C. Gross, Ann Lichens-Park, et Chittaranjan Kole, 127-50. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3_6).

Triplett, Lindsay R., S P. Cohen, C Heffelfinger, C L. Schmidt, A Huerta, C Tekete, V Verdier, A J. Bogdanove, et J E. Leach. 2016. « A resistance locus in the American heirloom rice variety Carolina Gold Select is triggered by TAL effectors with diverse predicted targets and is effective against African strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ». *The Plant journal : for cell and molecular biology* 87 (5): 472-83. <https://doi.org/10.1111/tpj.13212>.

Vera Cruz, C M., J Bai, I Oña, H Leung, R J. Nelson, T-W Mew, et J E. Leach. 2000. « Predicting Durability of a Disease Resistance Gene Based on an Assessment of the Fitness Loss and Epidemiological Consequences of Avirulence Gene Mutation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (25): 13500-505. <https://doi.org/10.1073/pnas.250271997>.

Verdier, V, C Vera Cruz, et J E. Leach. 2012. « Controlling rice bacterial blight in Africa: Needs and prospects ». *Journal of Biotechnology, Biotechnology for enhancing plant production and food quality - IBS 2010 Part III*, 159 (4): 320-28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.020>.

Wen-Ai, He, Da-hui Huang, Rong-bai Li, Yong-fu Qiu, Jian-dong Song, Hai-ning Yang, Jia-xing Zheng, et al. 2012. « Identification of a Resistance Gene bls1 to Bacterial Leaf Streak in Wild Rice *Oryza rufipogon* Griff. ». *Journal of Integrative Agriculture* 11 (6): 962-69. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60087-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60087-2).

Wonni, I., B. Cottyn, L. Detemmerman, S. Dao, L. Ouedraogo, S. Sarra, C. Tekete, et al. 2014. « Analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Population in Mali and Burkina Faso Reveals a High Level of Genetic and Pathogenic Diversity ». *Phytopathology* 104 (5): 520-31. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0213-R>.

Xia, Chun, Hongqi Chen, et Xudong Zhu. 2012. « Identification, Mapping, Isolation of the Genes Resisting to Bacterial Blight and Application in Rice ». *Molecular Plant Breeding* 3 (1). <http://biopublisher.ca/index.php/mpb/article/view/474>.

Yugander, Arra, Raman M. Sundaram, Kuldeep Singh, Duraisamy Ladhakshmi, Lella V. Subba Rao, Maganti Sheshu Madhav, Jyothi Badri, Madamsetty Srinivas Prasad, et Gouri Sankar Laha. 2018. « Incorporation of the novel bacterial blight resistance gene Xa38 into the genetic background of elite rice variety Improved Samba Mahsuri ». *PLoS ONE* 13 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198260>.

Zhu, Chengsong, Michael Gore, Edward S. Buckler, et Jianming Yu. 2008. « Status and Prospects of Association Mapping in Plants ». *The Plant Genome* 1 (1): 5-20. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2008.02.0089>.

### Les Figures:

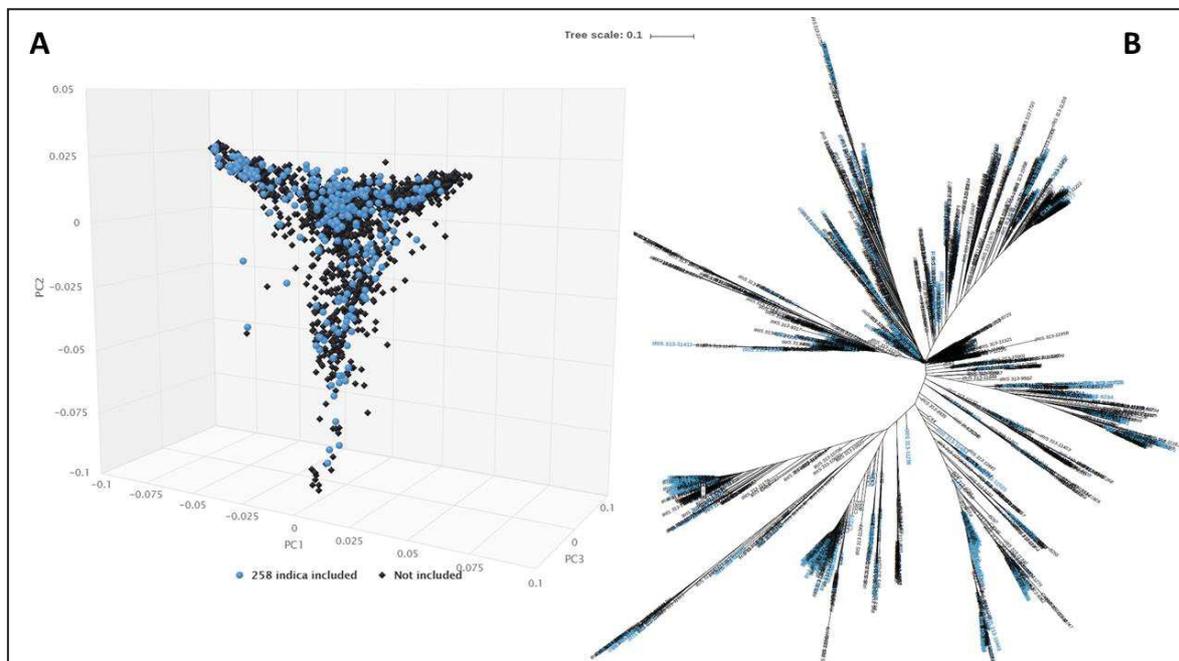


Figure 1: Représentativité du groupe indica 3K (au nombre de 1770 accessions) par le panel des 258 accessions sélectionnées suivant leurs origines géographiques pour les analyses GWAS. (A) Analyse en composantes principales (ACP) sur les 1770 accessions du groupe indica 3K utilisant 112.971 SNP uniformément répartis sur le long des chromosomes (randomly thinned every 1kb). (B) Arbre de distance basé sur les SNPs (Neighbor Joining) utilisant le même sous-ensemble de SNP. Les 258 accessions (représentées en bleu clair) sélectionnées et incluses dans notre étude sont réparties de manière homogène sur l'arbre.

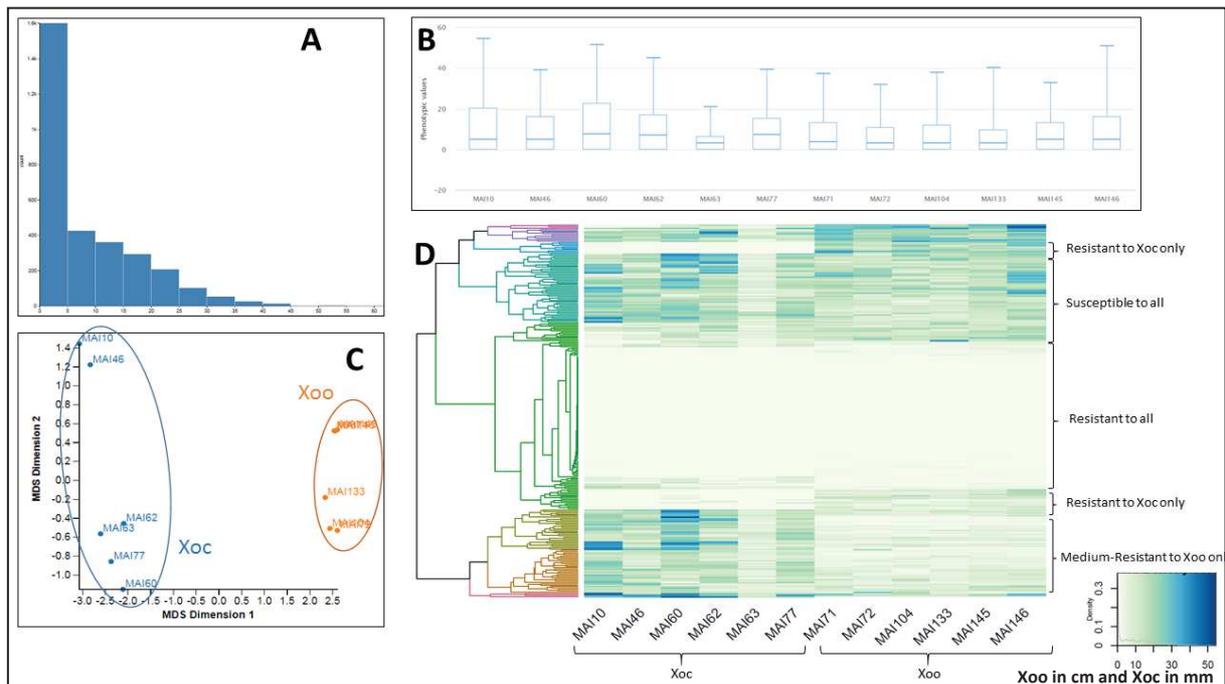
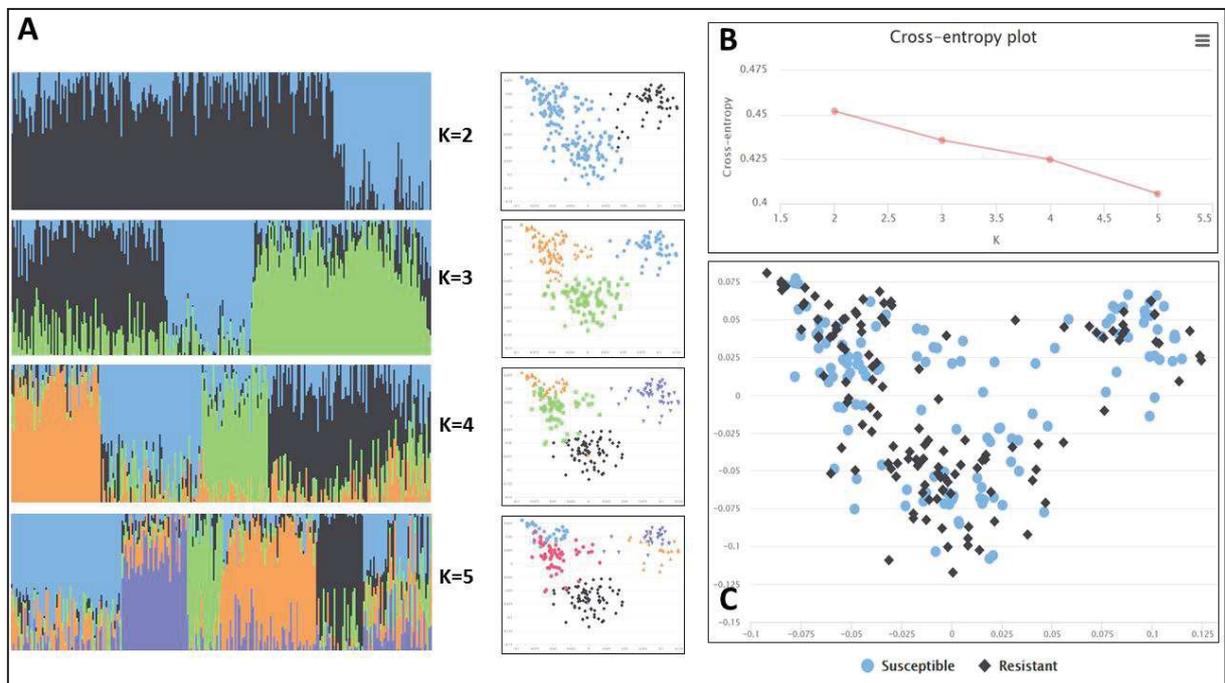
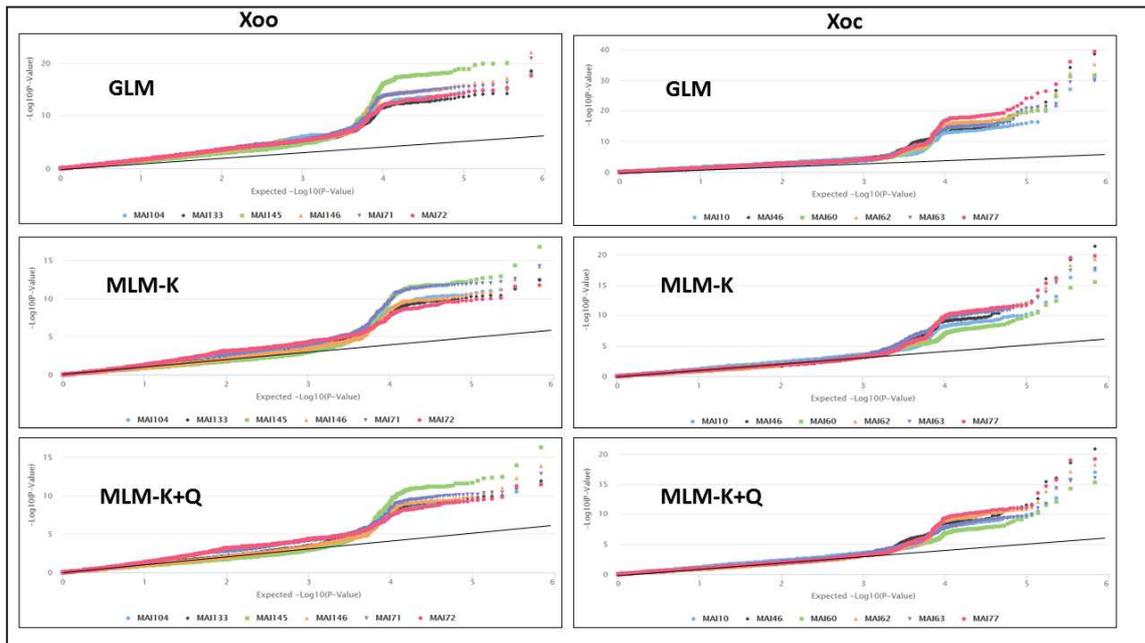


Figure 2: Analyse des données phénotypiques. (A) Distribution de la longueur de la lésion (cm) induite par les souches Xoo et Xoc sur les 258 lignes indica. (B) Boxplots de la virulence des souches Xoo et Xoc sur les 258 accessions indica (Représentation globale des données de virulence en fonction des souches). (C) La dispersion des souches de Xoo et Xoc. (D) Analyse de clusters des profils phénotypiques des 258 accessions testées avec les souches Xoo et Xoc. Les profils de virulence des souches de Xoo et Xoc sur les 258 accessions indica sont également observés. Sur le heatmap, chaque interaction (souche x accession indica) ou couleurs de cellules individuelles, code pour la longueur de lésion moyenne correspondante sur trois répétitions indépendantes de l'expérience.



Supplemental Figure 1: Structure de la population. A. Structure de la population d'un panel de 258 accessions indica obtenue avec sNMF. B. Analyse en composantes principales (ACP) de 258 accessions indica basée sur 68 786 SNP. La colorisation des accessions indica basée sur l'échelle de résistante / sensible révélé que le phénotype de résistance n'est pas associé à la structuration génétique



Supplemental Figure2: Quantile-quantile plots pour différents modèles testés pour GWAS: GLM, MLM-K et MLM-K + Q.

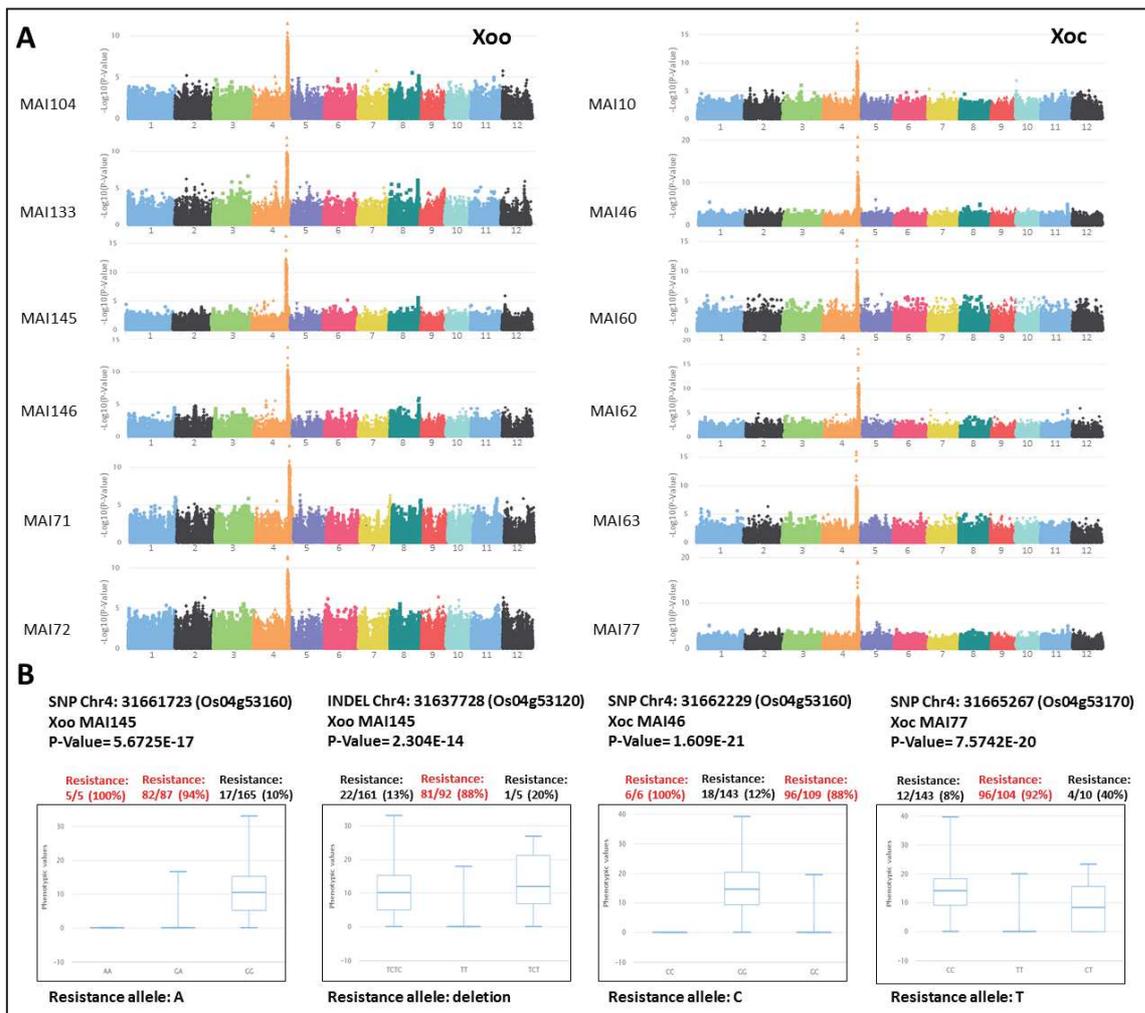


Figure 3: Etude d'association pangénomique (GWAS) basée sur les marqueurs (SNP et indels) associés à la résistance des accessions indica aux souches maliennes de Xoo et Xoc. Les analyses ont été faites suivant le modèle MLM-K + Q. (A) Manhattan plots (B) Boxplots pour 4 meilleurs marqueurs (hautement significatifs). L'échelle de résistance du riz ou de virulence pour chaque pathovars, (résistance si LL <= 5cm pour Xoo, LL <= 1cm pour Xoc)

Position	Variation	Alleles	MAF	%Missing	Gene	Gene annotation	Location in gene	Effect	Ranking for each strain											
									MAI104	MAI133	MAI145	MAI146	MAI71	MAI72	MAI10	MAI46	MAI60	MAI62	MAI63	MAI77
31662229	SNP	G/C	23.4%	0%	LOC_Os04g53160	NBS-LRR disease resistance protein, putative, expressed	exon	NON_SYNONYMOUS_CODING	44	16	12	8	78	5	2	1	1	2	1	2
31665267	SNP	C/T	42.4%	0.4%	LOC_Os04g53170	bromodomain containing protein, expressed	exon	NON_SYNONYMOUS_CODING	4	4	2	4	12	1	1	2	2	1	2	1
31661723	SNP	G/A	18.9%	0.4%	LOC_Os04g53160	NBS-LRR disease resistance protein, putative, expressed	exon	NON_SYNONYMOUS_CODING	2	3	1	1	2	2	3	4	3	3	5	4
31637728	indel	T/TA	37.6%	0%	LOC_Os04g53120	NB-ARC domain containing protein, expressed	promoter (1kb upstream)	#	1	2	4	2	1	4	39	20	20	11	14	12
31637516	indel	TC/T	36.6%	0%	LOC_Os04g53120	NB-ARC domain containing protein, expressed	promoter (1kb upstream)	#	3	3	3	3	3	7	41	17	21	14	15	10
31662295	SNP	G/T	26.7%	0.4%	LOC_Os04g53160	NBS-LRR disease resistance protein, putative, expressed	exon	NON_SYNONYMOUS_CODING	#	56	70	55	117	26	9	3	4	4	3	3
31605706	indel	TGATATTTTA/T	36.0%	0%	LOC_Os04g53060	NBS-LRR disease resistance protein, putative, expressed	exon	CODON_DELETION	#	110	102	111	#	106	4	5	14	5	4	5
31676482	SNP	T/C	34.8%	0.4%	intergenic	#	#	#	#	99	112	100	108	66	5	6	9	6	6	6
31685223	indel	TC/TT	28.9%	0%	intergenic	#	#	#	5	11	10	11	9	3	23	36	18	29	25	23
31632341	indel	C/CAG	28.5%	0%	LOC_Os04g53110	hypothetical protein	intron	#	21	7	6	5	7	32	22	11	5	9	8	8
31639274	indel	G/GATA	15.1%	0%	LOC_Os04g53110	hypothetical protein	UTR_5_PRIME	#	10	6	5	7	5	36	14	9	12	13	7	16
31616212	indel	TC/T	28.9%	0%	intergenic	#	#	#	33	5	9	6	8	34	21	19	6	16	13	7
31637101	indel	G/GT	30.4%	0%	LOC_Os04g53120	NB-ARC domain containing protein, expressed	promoter (1kb upstream)	#	8	10	11	10	4	80	26	23	22	23	10	27

Table 1: Résumé des marqueurs significatifs (SNP et indels) détectés par les analyses GWAS (modèle MLM-K + Q) parmi les différentes souches de *Xanthomonas*. Pour chaque souche, nous avons rapporté les 5 meilleurs marqueurs significatifs (les 5 meilleurs marqueurs avec les valeurs p les plus élevées) et attribué un classement afin de comparer les marqueurs et les analyses.

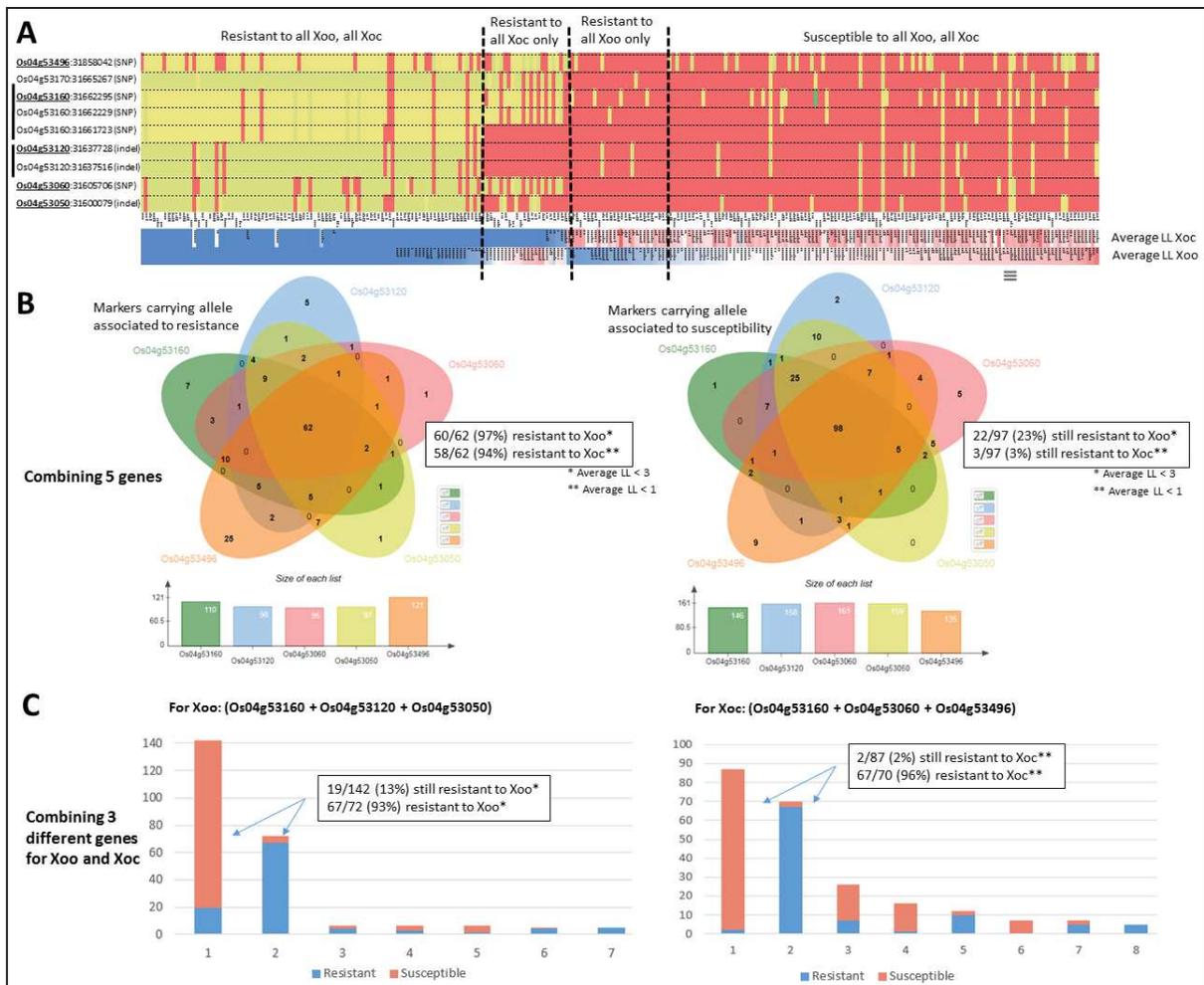


Figure 4: Combinaison des marqueurs de cinq gènes NBS-LRR couverts par la région QTL du chromosome 4. (A) Matrice de génotypage pour les 7 meilleurs marqueurs et deux autres marqueurs situés dans les gènes NBS-LRR, associés aux phénotypes. (B) Diagramme de Venn basé sur la combinaison de 5 gènes NBS-LRR. (C) Histogramme de résistance après combinaison de 3 gènes différents pour Xoo et Xoc (4 et 5 marqueurs respectivement)

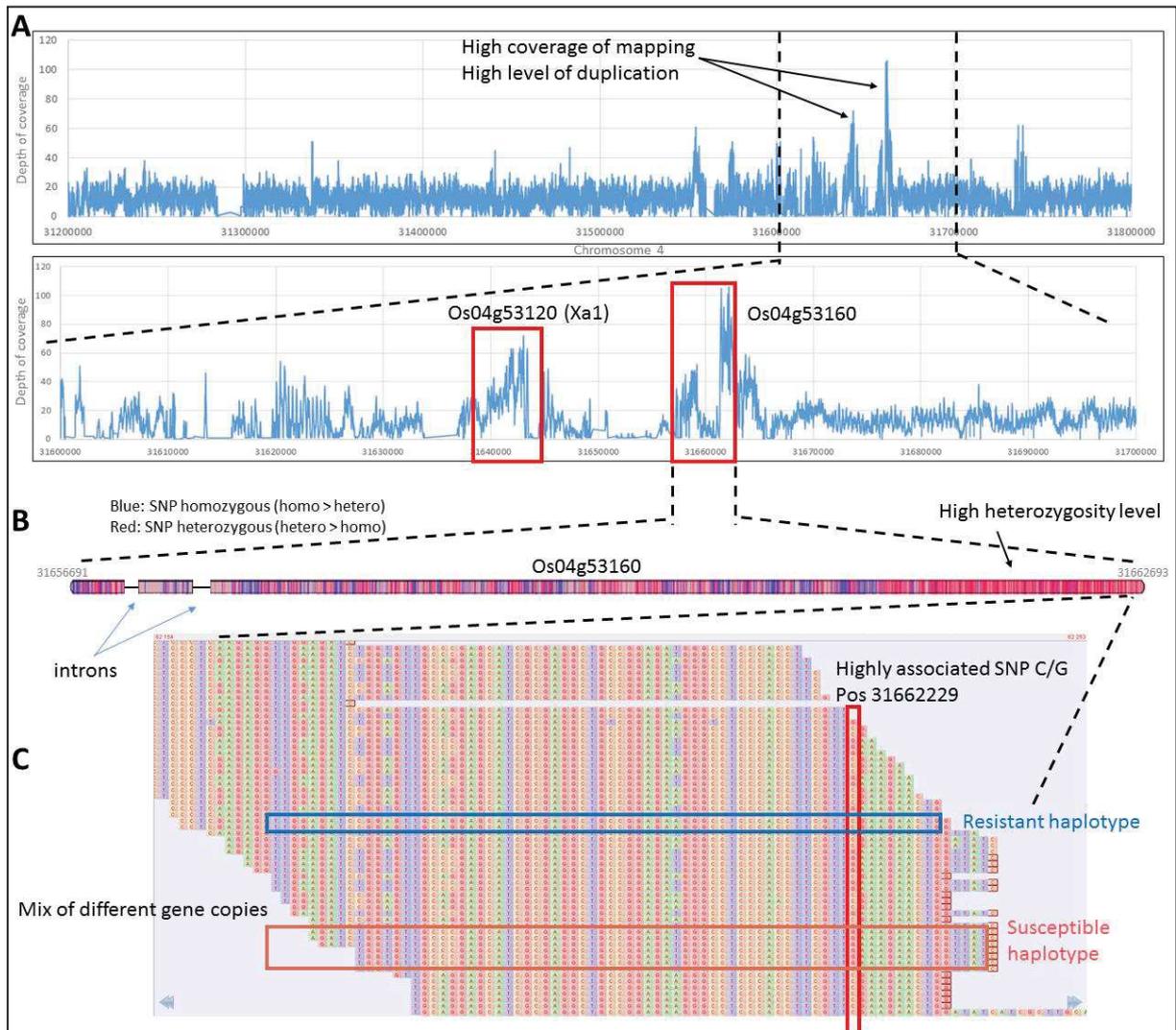


Figure 5: La duplication des gènes R dans le QTL majeure du chromosome 4 explique le niveau élevé d'hétérozygotie. (A) L'analyse de la profondeur de couverture des reads le long de la région du QTL principale (major) révèle des régions fortement couvertes dans 2 gènes NBS-LRR: Os04g53120 (Xa1) et Os04g53160, ce qui suggère une duplication en tandem de ces gènes. Cela pourrait expliquer le niveau élevé d'hétérozygotie dans les marqueurs significatifs (31662229 et 31661723). (B) Distribution des SNP homozygotes (bleu) et hétérozygotes (rouge) dans le gène Os04g53160. (C) Le focussur l'alignement des reads chez Os04g53160 (avec le logiciel Tablet) de la région du marqueur significatif SNP 31662229 permet de suivre les haplotypes locaux associés à la résistance ou à la susceptibilité

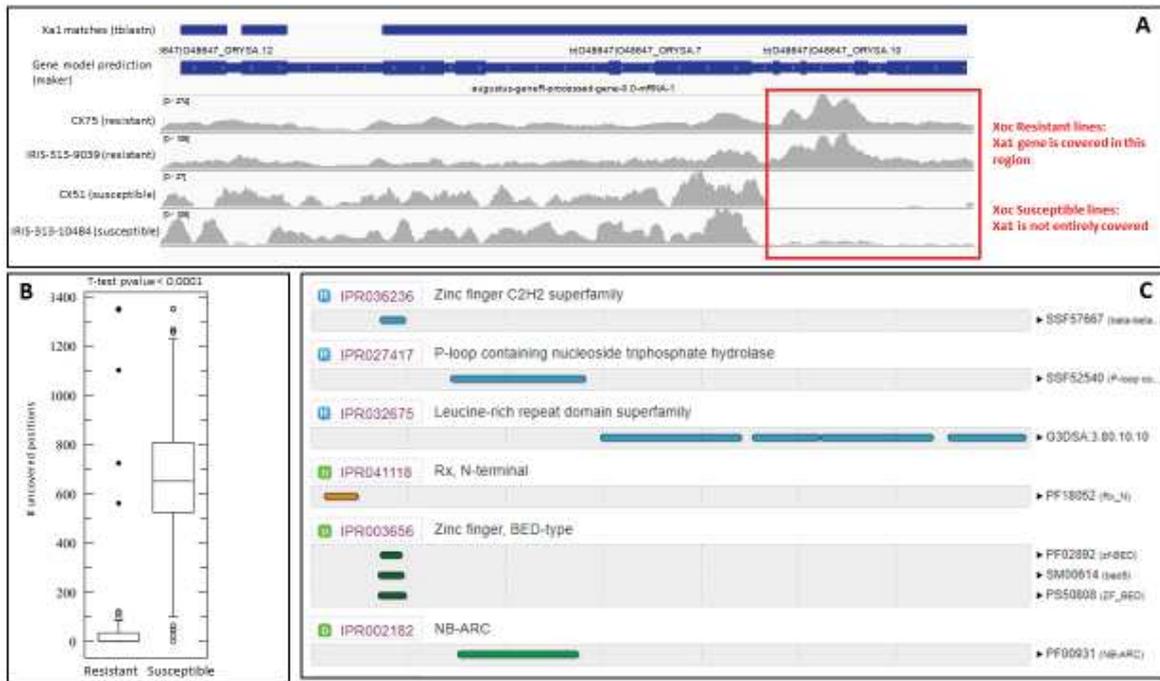


Figure 6: L'analyse de la profondeur de couverture des reads sur le long du gène Xa1. (A). L'analyse de la profondeur de couverture des reads le long du gène Xa1, révèle une région génique fortement couverte chez les accessions résistantes et très faiblement couverte chez les accessions sensibles. (B). Sur la base des 258 accessions indiciales criblées pour leurs réactions aux souches testées, l'analyse de la profondeur de couverture des reads sur le long du gène Xa1, a révélé un très faible niveau de non couverture de la région génique chez les accessions résistantes à Xoc et un niveau élevé de non couverture de la même région génique de Xa1 chez les accessions sensibles à Xoc. (C). Présentation de l'absence du domaine de la super famille des répétitions riches en leucine (leucine-rich repeat domain superfamily) dans la région N-terminal chez les accessions sensibles à Xoc.

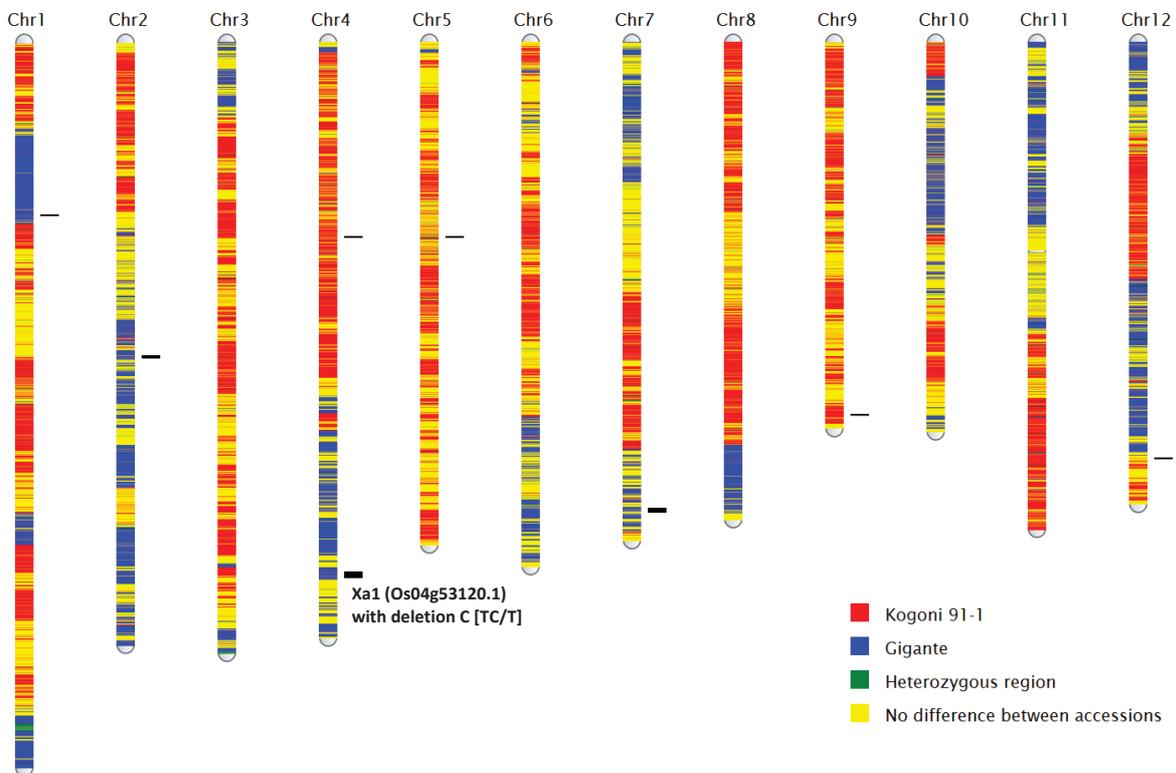


Figure 7: Structure des chromosomes de SK20-28 SK20-2 issue du croisement entre Giganté et Kogoni 91-1. Le variant du gène Xa1 observé sur la région QTL du chr4, présente une délétion dans sa région promotrice. Cette délétion aurait renforcé son potentiel de résistance pour finalement contrôler les 7 races Xoo décrites au Mali.

## Chapitre 6

Discussion générale et Perspectives

## Chapitre 6 : Discussion Générale

L'étude de la réponse du riz à l'infection par *Xoo* et *Xoc* et l'évolution de ces deux agents pathogènes pour contourner les systèmes de défense et gènes de résistance de la plante hôte constitue un modèle très intéressant. Elle permet notamment d'approfondir les connaissances sur les méthodes de contrôle de ces bactéries phytopathogènes. Au-delà du modèle, le riz constitue la base de l'alimentation humaine au Mali et sa production occupe une place de choix dans l'agriculture du pays.

Lors de l'infection *Xoo* utilise un arsenal de protéines lui permettant de coloniser la plante. Parmi celles-ci figurent les protéines effectrices TALs (Transcription Activator-Like), qui sont transloquées dans le cytoplasme de la cellule hôte puis dans le noyau. Elles activent la transcription du gène cible après fixation de la protéine TAL sur l'EBE (Effector Binding Element) de la région promotrice du gène ciblé. La colonisation de l'hôte par la bactérie n'est possible que si le gène hôte cible est un gène de sensibilité. Cependant, quand le gène hôte cible est un gène de résistance, le mécanisme induit empêche la bactérie de provoquer la maladie. Les protéines TALs et les gènes cibles régulent les mécanismes de compatibilité ou d'incompatibilité entre *Xoo* et leur hôte. Le nombre élevé des effecteurs TAL chez *X. oryzae* contribuent à la variabilité de la structure des populations de *Xoo* et *Xoc*.

L'étude de la diversité des populations bactériennes ainsi que la répartition géographique des groupes de virulence au sein de cette population sont un prérequis indispensable pour l'identification de sources de résistance durable et à large spectre. De même elles sont essentielles pour orienter le choix d'une méthode de lutte efficace contre la maladie. Par ailleurs, la grande diversité des ressources biologiques disponibles chez le riz facilite l'acquisition des connaissances sur le pathosystème riz-*Xoryzae*, notamment pour l'amélioration de la résistance variétale du riz aux maladies. Malgré les différents rapports faisant état de la présence du BB en Afrique de l'Ouest dès 1979 (EPPO 2017; Buddenhagen et al. 1979) ainsi que du BLS en 2003 (Gonzalez et al. 2007; Sarra et al. 2010), aucun programme d'amélioration n'a encore été mis en place au Mali pour lutter contre ces deux maladies. Pourtant, partout où nous nous sommes rendus sur le terrain pour effectuer des prospections avec comme objectif l'évaluation de l'incidence de la maladie et le prélèvement d'échantillons pour l'identification des agents pathogènes, les paysans nous ont toujours posé la question de savoir quelles solutions nous pourrions proposer pour lutter contre ces maladies.

L'introduction de gènes de résistance dans les variétés de riz élites est considérée comme étant l'une des alternatives pour lutter contre ces agents pathogènes. Deux approches sont actuellement disponibles en amélioration génétique pour l'obtention de variétés de riz possédant une résistance à large spectre au BB et BLS: 1. l'édition du génome qui consiste à faire une mutation ciblée dans la région EBE du gène cible du TAL d'une lignée sensible pour

empêcher la protéine TAL de se fixer et de transcrire sa cible, 2. Identifier des variétés résistantes ou populations de lignées obtenues par croisements adaptés à l'environnement ciblé et identifier le déterminisme génétique qui sous-tend la résistance.

La première approche a été développée dans nos laboratoires (LBMA et IRD) dans le cadre de la thèse d'Hinda Doucouré (Doucouré et al. 2018). Ses travaux ont pour but de créer de la résistance chez les variétés de riz portant différents allèles de gènes de sensibilité ciblés par les TALEs des souches maliennes de *Xoo*. En effet, l'édition des boîtes ADN de SWEET14 ciblées par des effecteurs TAL majeurs des souches maliennes a effectivement conduit à l'obtention de la résistance contre les souches qui utilisent TalF pour causer la maladie. Cependant, cette résistance est contournée par les souches qui transloquent TalC pour transcrire le gène cible dans la cellule hôte (Doucouré et al. 2018).

Mes travaux visent à identifier les sources de résistance à large spectre contre les deux maladies bactériennes principales (BB et BLS) au Mali. L'obtention d'une importante collection de souches de *Xoo* et *Xoc* et les connaissances développées sur la diversité génétique des souches obtenues sont à la base de ces travaux. En effet, les missions de collecte effectuées au Mali dans les principales régions rizicoles depuis 2009 ont abouti à l'obtention et à la caractérisation de plusieurs centaines de souches de *X. oryzae* conservées à la fois dans notre laboratoire au LBMA à Bamako et à l'IRD Montpellier.

L'analyse des données de pouvoir pathogène des souches de *X. oryzae* sur différentes variétés de riz (isogéniques et variétés cultivées) a révélé l'existence 1. de nouvelles races de *Xoo* et confirmé la présence d'une race de *Xoo* préalablement identifiée en 2003 au Mali et sur des souches isolées il y a quarante ans et 2. des groupes de virulence au sein des souches de *Xoc*. Différents pathotypes ont par ailleurs été caractérisés parmi les souches de *Xoo* comme celles de *Xoc* sur les variétés cultivées localement, sur les lignées MAGIC *indica*, ainsi que sur un panel de 258 lignées *indica* issues du projet 3000 génomes de riz (3K) de l'IRRI et ses partenaires.

Les tests de résistance variétale chez le riz ont permis l'identification de deux variétés locales possédant une résistance à large spectre vis-à-vis des souches des deux pathovars de *X. oryzae*. Les analyses GWAS sur les données de longueur de lésion observées entre variétés et souches de *Xoo* et *Xoc* ont permis de mettre en évidence plusieurs QTLs de résistance à large spectre (ou en anglais BRS pour Broad Resistance Spectrum) sur les variétés de riz MAGIC. De même, un QTL majeur et des gènes candidats de résistance à large spectre contre les deux pathovars de *X. oryzae* ont été identifiés sur les génomes des lignées 3K. Ces informations sont importantes pour les sélectionneurs dans le cadre du développement d'un futur programme de résistance variétale contre *X. oryzae* au Mali.

## 1. La structure des populations de *Xoo* et *Xoc* apparaissent diverses et évoluent dans le temps.

Un agent pathogène d'une culture de base majeure comme le riz suit un processus évolutif et écologique complexe (Midha et al. 2017). Des études génomiques ont révélé que le rythme de cette évolution peut être très variable chez les bactéries pathogènes (Biek et al. 2015). En effet, la structure en race des souches de *Xoo* collectées entre 1979 et 2003 au Mali était, en ce temps, unique. Et une seule race avait été identifiée au Mali (race A3), race incompatible avec l'ensemble des lignées isogéniques (IRBBs) et du parent récurrent IR24 (Gonzalez et al. 2007).

En 2019, la population de *Xoo* est plus diversifiée avec l'existence de six nouvelles races toutes compatibles avec la variété IR24. En 40 ans, date de la première collecte de *Xoo*, la riziculture a considérablement évolué au Mali. En effet, les riz traditionnels cultivés ont été remplacés par des variétés à plus fort rendement tel que Kogoni 91-1. Dans le contexte de la libéralisation du secteur semencier, nous observons une augmentation significative du nombre de variétés cultivées dans une même zone de production en même temps que le retrait ou l'abandon des variétés anciennes peu productives (c'est le cas de nombreuses variétés parmi lesquelles BG90-2 abandonnée en raison de sa sensibilité à la virose).

Les variétés Kogoni 91-1 et Adny 11 sont, de nos jours, les plus cultivées dans les périmètres irrigués au Mali dont la maîtrise de l'eau est totale. Dans cette étude, nous avons montré que Kogoni 91-1 est résistante à la plupart des souches de *Xoo*, par contre, cette variété est très sensible à *Xoc*. A l'inverse, la variété Adny 11 est très sensible à *Xoo* et résistante à la majorité des souches de *Xoc*. En serre, la plupart des autres variétés de riz locales testées sont très sensibles aux souches des deux pathovars de *X.oryzae*, ce qui corrobore les observations faites en champ. Cependant, deux variétés cultivées, SK20-28 et Giganté, sont très résistantes à l'ensemble des souches de *Xoo* et *Xoc*. Ces données devraient permettre de mieux appréhender les facteurs génétiques de la plante pouvant expliquer la diversité de la structure des populations de *X. oryzae* au Mali.

Si maintenant nous avons acquis une meilleure connaissance sur la structure des races de *Xoo* et leur répartition dans les différentes régions rizicoles au Mali, leur évolution et possible adaptation à la plante hôte restent à élucider. En effet, aucun gène de résistance connu de type *Xa* n'a à ce jour été déployé au Mali pour lutter contre la bactériose foliaire du riz. Les races de *Xoo* évoluent dans le temps sous l'effet de la sélection naturelle des gènes fonctionnels dans la plante hôte (Vikal et al. 2017). L'émergence de nouvelles populations d'agents phytopathogènes est relativement fréquente dans le paysage agricole et sont généralement associées à des événements de sélection dans la population de plantes hôtes

(Burdon et al. 2008). Le déploiement généralisé de gènes R (Mew et al. 1992) et l'apparition de mutations au sein des variétés de riz cultivées en milieu naturel sont à l'origine de l'émergence de nouvelles races de *Xoo* (Ochiai et al. 2005). En effet, aux Philippines, la race de *Xoo* compatible avec le gène de résistance *Xa4* a remplacé la race 1 de *Xoo* qui était prédominante et cela, suite au changement de variétés de riz cultivés au début des années 70 par des variétés portant le gène *Xa4* ( Mew et al. 1992; Quibod et al. 2016). Les gènes de résistance des variétés cultivées peuvent également exercer une pression de sélection sur les populations maliennes de *Xoo* et de *Xoc*.

Aucun des gènes R connu que nous avons testé ne contrôle l'ensemble des races de *Xoo* décrites au Mali. L'inefficacité d'un gène R à contrôler toutes les races est en relation avec la co-évolution de l'agent pathogène avec son hôte (Mishra et al. 2013). Caractérisées sur les mêmes lignées IRBBs et IR24, les races *Xoo* décrites au Mali sont distinctes de celles décrites dans la sous-région à savoir au Burkina, au Niger, au Cameroun et également en Asie. Chaque programme de sélection déploie en général ses propres variétés élites dans des agroécosystèmes spécifiques et avec des pratiques culturelles différentes. Les populations de *Xoo* ou *Xoc* présentes s'adaptent aux variétés cultivées et aux conditions environnementales ce qui peut expliquer la diversité des races ou pathotypes de *X.oryzae* en présence.

L'analyse phylogénétique basée sur des séquences partielles du gène *gyrB* d'une large collection de souches de *X. oryzae* d'origines géographiques diverses, a révélé que celles-ci étaient réparties en 5 lignées génétiques distinctes : *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*), *X. oryzae* pv. *oryzae* asiatiques (*Xoo* Asie), *X. oryzae* pv. *oryzae* africaines (*Xoo* Afrique), *X. oryzae* US et *X. campestris* pv. *leersiae* (*Xcl*) récemment renommée *X.oryzae* pv. *leersiae* (Triplett et al. 2011; Wonni et al. 2014). Cette classification génétique a été récemment confirmée par une analyse phylogénomique des souches de *X. oryzae*. En effet, cette analyse basée sur l'étude d'une centaine de souches *Xoo* d'Inde, a révélé que le cluster formé par les souches *Xoo* d'Inde et d'Asie était distinct des souches de *X. oryzae* d'Afrique et d'Amérique (Midha et al. 2017). Ces analyses basées sur des marqueurs génomiques ont également révélé que les souches *Xoc* semblaient être une lignée variante des populations de *Xoo* (Midha et al. 2017). Aussi, les analyses MLST (Hajri et al. 2012; Triplett et al. 2011), RFLP, AFLP et rep-PCR (Gonzalez et al. 2007) avaient suggéré que les *Xoo* d'Afrique étaient plus proche de *Xoc* que des *Xoo* d'Asie. Les populations US de *X. oryzae* sont caractérisées par l'absence d'effecteur TAL et une faible virulence (Triplett et al. 2011). Les marqueurs MLVA 16 ont aussi permis de distinguer les races en fonction des deux sites de collecte et selon les périodes d'échantillonnage (Poulin et al. 2015). Les souches de *X. oryzae* pv. *leersiae* (*Xol*) d'Afrique et d'Asie forment un seul groupe distinct (Wonni et al. 2014). Au Mali, les deux races dominantes, A5 et A6, sont présentes à Selingue et dans la région de l'Office du Niger.

L'intensification de l'agriculture est un paramètre connu pour son influence sur l'évolution de la structure des populations de pathogènes. L'intensification de la riziculture est

cependant récente en Afrique si on compare à l'Asie où les deux sous-espèces de riz (*Indica* et *Japonica*) les plus cultivées ont été domestiquées il y a 5 000 ans. Gonzalez et al. (2007) ont émis des hypothèses sur l'origine et l'évolution des populations de *X. oryzae* en Afrique et suggéré une origine asiatique pour les souches de *X. oryzae* africaine. Une analyse de comparaison des populations de *X. oryzae* n'a révélé jusqu'alors aucun haplotype commun entre les deux continents. Il est connu que des variétés de riz asiatiques ont été introduites au début des années 50 en Afrique et il n'est pas exclu qu'il y ait eu des échanges de matériel génétique contaminé entre les deux continents. Les souches Maliennes de *Xoc* sont génétiquement proches des souches de Malaisie, pays d'origine de la variété Seberang MR77, encore cultivée au Mali. En général, on constate qu'au moins un parent des nombreuses variétés élites cultivées au Mali est originaire d'Asie. C'est le cas par exemple d'IR-36 qui a été utilisé pour développer la variété Kogoni 91-1.

## 2. *Oryza sativa indica* possède des sources de résistance efficaces contre BB et BLS

*Oryza sativa indica* est l'une des deux sous-espèces de riz les plus cultivées avec *O. sativa japonica*, en Asie du Sud et en Afrique de l'Ouest. Les variétés indica occupent en effet 80% de la superficie consacrée à la riziculture dans le monde (Hiei et al. 2015). Les variétés élites cultivées au Mali sont majoritairement des *indica* et présentent des niveaux de résistance variable aux *Xoo* et *Xoc*. En plus des deux variétés SK20-28 et Giganté contrôlant l'ensemble des 7 races de *Xoo* et les pathotypes de *Xoc* décrits dans cette thèse, une dizaine de variétés cultivées au Mali montrent des niveaux de résistance variable.

A partir de l'analyse QTL de la population IR64 x Azucena, Djedatin et al. (2016) ont montré que les allèles donneurs de la résistance contre les souches *Xoo* d'Afrique provenaient de la variété *indica* IR64. Sur la dizaine de QTLs cartographiés sur neuf des chromosomes du riz, quatre ont été cartographiés dans des régions génomiques où des QTLs et gènes majeurs de type *Xa* ont été précédemment caractérisés à partir d'autres variétés. Les travaux de Djedatin suggèrent que les gènes majeurs de résistance à *Xoo* d'Afrique et d'Asie peuvent être communs à plusieurs accessions de riz. *Oryza sativa indica* offre une base génétique de résistance intéressante contre le BB en Afrique et en Asie (Djedatin et al. 2011, 2016). Compte-tenu de l'intérêt des améliorateurs pour cette variété dans les programmes de sélection variétale, plus de 60.000 mutants d'IR64 ont été obtenus par mutagenèse (Wu et al. 2005).

Afin de faciliter l'identification des caractères agronomiques d'intérêt potentiel d'*Oryza sativa indica*, le génome du cultivar 93-11 a été séquencé par l'Institut du génome de Beijing (BGI) (Yu et al. 2002). Ce génome est très similaire à celui de *japonica* MSU v7 (Kawahara et al. 2013), variété qui est généralement limitée aux régions rizicoles tempérées telles que celles du Japon. Le séquençage des génomes de riz dits de référence a été suivi d'autres projets comme celui du séquençage de 3000 génomes de riz ou « projet 3000 génomes de riz » (Li et

al. 2014). Ce projet, relativement récent, constitue une étape majeure dans l'étude de la diversité génétique des collections de riz mondiales. Les analyses phylogénétiques ont montré une nette différenciation génétique au sein des 3000 accessions réparties en deux principaux groupes *indica* et *japonica*. Deux autres groupes, les types aus / boro et basmati / sadri, ainsi qu'un groupe de type intermédiaire ont été identifiés (Li et al. 2014). Le groupe *indica* représente le groupe le plus vaste et le plus diversifié avec 1 770 accessions (soit 58,2%). Le groupe *japonica* est représenté par 843 accessions, soit 27,9% (Li et al. 2014).

Le crible variétal que j'ai conduit sur 258 accessions du groupe *indica* (sélectionnées suivant leurs origines géographiques et originaires de 89 pays) a révélé que plus d'une centaine d'entre-elles portaient au moins une source de résistance contre le BB et le BLS. L'analyse GWAS sur les 258 accessions a permis de mettre en évidence plusieurs QTLs parmi lesquels un QTL à large spectre de résistance contre l'ensemble des races de *Xoo* et des pathotypes de *Xoc* décrits au Mali. Les analyses bio-informatiques conduites sur la région génomique associée à ce QTL (de type BRS) ont permis de mettre en évidence deux nouveaux gènes R candidats très efficaces contre les souches maliennes de *Xoo* et *Xoc*. Cette région colocalise avec le gène *Xa38* (Cheema et al. 2008) et le gène *Xa1* (Yoshimura et al. 1996; Yoshimura et al. 1998) qui porte sur son promoteur l'EBE de TaIE. Une délétion dans cet EBE serait associée à la résistance à certaines races de *Xoo* décrites au Mali. Quant à la bonne couverture de l'extrémité 3' terminale (domain LRR) du gene, elle serait associée à la résistance contre les deux pathovars au Mali. La prédiction des cinq allèles R candidats sur les 3000 génomes a révélé que plusieurs centaines d'accessions *indica* 3K portent au moins un de ces gènes candidats dans leurs génomes. Le diagramme de Venn sur les accessions portant ces gènes candidats a révélé que celles-ci portent une combinaison de 2 à 5 de ces gènes. Ceci suggère que depuis la domestication du riz, les programmes d'amélioration variétale, la pression de sélection naturelle et les recombinaisons génétiques, ont pu conduire au pyramidage de gènes de résistance.

Les génomes d'*Oryza sativa Indica* font une taille d'environ 466 méga bases ce qui correspond à environ 46 000 à 55 000 gènes (Yu et al. 2002). Plusieurs QTLs de résistance au BB et BLS ont été cartographiés et des gènes clonés dans différentes régions chromosomiques du riz. A l'exception des travaux pionniers de Djedatin (2016) sur les souches africaines de *Xoo* et *Xoc*, ceux-ci portent sur des QTLs de résistance contre les souches asiatiques de *Xoo* et *Xoc*. L'analyse GWAS (faite à partir d'un panel diversifié de 285 accessions de riz et neuf souches de *Xoo* représentatives de huit des races identifiées aux Philippines) a révélé que les marqueurs SNP associés à la résistance sont identifiés dans un sous-ensemble de 198 accessions *indica* et cartographiés sur les chromosomes 5, 6, 9, 11 et 12 (Dilla-Ermita et al. 2017). L'analyse GWAS conduite sur 172 accessions d'*indica* avec six souches de *Xoo* GD1358 (race C5) et V (race GV) de Chine, PXO61 (race P1), PXO340 (race P3c), PXO339 (race P9a) et PXO99 (race P6) des Philippines a montré l'existence de 12 loci de résistance comprenant 121 associations (SNPs) significatives sur les chromosomes 2, 3 et 6 ± 12 (Zhang et al. 2017). Un panel d'une douzaine de gènes de résistance a déjà été identifié et cartographié dans les

cultivars *indica*, notamment *Xa2*, *Xa4*, *Xa11*, *Xa16*, *xa25(t)*, *xa26(t)*, *xa28(t)*, *xa34(t)*, *Xa39*, *Xa40*, *Xa42* et *Xa18* (Vikal et al. 2017). Les seuls gènes connus pour la résistance à *Xoc* ont été identifiés sur le maïs (*RXo1*) (Zhao et al. 2004) et plus récemment dans *Oryza rufipogon* (*bls1*) (Wen-Ai et al. 2012).

Afin d'exploiter au mieux leur diversité, des lignées de riz *indica* élites sélectionnées pour des caractères génétiques d'intérêt agronomique majeur, ont été utilisées pour développer la population MAGIC *indica* (8 parents *indica*), la population MAGIC plus et MAGIC Global (16 parents - 8 *indica* et 8 *japonica*). L'objectif est d'affiner la cartographie des QTL pour des caractères d'intérêt agronomique multiple (rendement et qualité des grains) et d'identifier les gènes associés à la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Bandillo et al. 2013). La population MAGIC *indica* est la plus avancée des populations MAGIC développée à ce jour par l'IRRI avec 1328 lignées. La caractérisation de ces lignées recombinées a permis d'identifier plusieurs gènes majeurs et QTLs, notamment, le gène *Sub1* associé à la tolérance à la submersion, les gènes *Xa4* et *xa5* associés à la résistance au flétrissement bactérien (BB) et d'autres loci potentiellement nouveaux, associés à des caractères essentiels pour l'amélioration du riz (Bandillo et al. 2013).

Suite aux résultats obtenus en Asie sur cette population, nous avons mis en place les essais de résistance au BB et BLS sur le panel des 360 lignées MAGIC *indica* à la fois en serre (Colorado State University) et au champ au Mali. Cette étude nous a permis de progresser dans nos connaissances sur le déterminisme génétique de la résistance du riz au BB et BLS vis-à-vis des souches *Xoo* et *Xoc* maliennes et de mettre en évidence une dizaine de QTLs majeurs de type « broad spectrum resistance » (BSR) ainsi que des gènes candidats identifiés dans ces régions QTLs. Nos travaux complètent ainsi les résultats obtenus par Djedatin en 2014 et ouvrent la voie vers des analyses plus fines de caractérisation et validation fonctionnelle des gènes impliqués dans la résistance aux souches africaines de *Xoo* et *Xoc*.

### 3. Les gènes de résistance connus et efficaces pour le contrôle du BB et du BLS en Asie, le sont beaucoup moins au Mali.

Aliment prisé par plus de la moitié de la population mondiale, le riz revêt une importance primordiale dans l'alimentation humaine. L'amélioration variétale pour la résistance aux maladies est un enjeu stratégique pour la riziculture dans notre pays. Aucun gène de résistance efficace contre les souches maliennes de *X. oryzae* (*Xoo* et *Xoc*) n'était connu au démarrage de cette thèse. Le crible des lignées de riz isogéniques portant des gènes majeurs de résistance contre les *X. oryzae* asiatiques, a été mis en place au Mali et montre qu'aucun des gènes de résistance testé n'est efficace contre l'ensemble des races de *Xoo*.

Concernant la résistance au BLS, le gène *Rxo1*, théoriquement efficace contre les *Xoc* asiatiques (Zhao et al. 2004) n'est pas fonctionnel contre les *Xoc* du Mali. En effet, la réaction

compatible ou incompatible entre *Xoc* et la variété de riz portant *Rxo1* repose sur l'interaction spécifique entre le gène d'avirulence *avrRxo1* de *Xoc* et *Rxo1*. Les souches *Xoc* d'Asie portent toutes le gène *avrRxo1*, le gène *Rxo1* est donc fonctionnel et potentiellement efficace pour lutter contre le BLS (Zhao et al. 2004). Nous avons confirmé que ce n'est pas le cas avec les souches *Xoc* du Mali dont un bon nombre ne portent pas le gène *avrRxo1*.

#### 4. Les populations de *Xoo* et *Xoc* du Mali induisent une résistance spécifique chez le riz

Plusieurs études ont montré que les populations *Xoo* d'Afrique se distinguent génétiquement très clairement de celles d'Asie (Gonzalez et al. 2007; Tran et al. 2018; Doucouré et al. 2018) et induisent des résistances spécifiques chez le riz. Il ressort en effet des analyses de GWAS et d'évaluation de la résistance aux souches de *Xoo* représentatives des différentes races africaines et Philippines, que deux loci localisés sur les chromosomes 7 et 11 du riz, sont impliqués spécifiquement dans la résistance aux souches africaines de *Xoo* (Djedatin et al. 2016).

Le crible des variétés cultivées au Mali que nous avons mené, nous a permis de mettre en évidence une source de résistance à large spectre contre l'ensemble des races de *Xoo* et contre les souches de *Xoc* décrites dans cette étude. A partir de l'analyse des données de séquences génomiques de variétés SK20-28 ainsi que ses deux parents Giganté et Kogoni 91-1, nous montrons que cette résistance semble associée à un variant du gène majeur de résistance *Xa1* (Yoshimura 1993; Yoshimura et al. 1998) qui porte une délétion « C » (pour cytosine) dans la région EBE de TalE. Cependant, cette résistance ne contrôle pas les souches asiatiques de *Xoo* et *Xoc* testées. Cette résistance spécifique aux souches *Xoo* africaines peut s'expliquer par le fait que les souches *Xoo* africaines présentent des caractéristiques génétiques particulières par rapport à celles d'Asie (Gonzalez et al. 2007). En effet, il existe deux caractéristiques principales chez les souches asiatiques de *X.oryzae* par rapport à celles d'Afrique: une grande abondance d'éléments d'insertion (ou IS) et la prévalence d'effecteurs TAL (Ochiai et al. 2005; Niño-Liu et al. 2006). Si le contenu en IS1112 est assez réduit dans le génome des *Xoo* d'Afrique et qu'elles ne possèdent aucune copie de l'élément IS1113 (TnX1), les souches asiatiques en ont un nombre assez élevé dans leurs génomes (Chain et al. 2004; Nierman et al. 2004). Le rôle des éléments IS dans l'évolution des races de *Xoo* d'Asie a été largement documenté notamment lors de l'analyse des deux premiers génomes de *Xoo* séquencés (Lee et al. 2005; Ochiai et al. 2005). Par ailleurs, les souches africaines de *Xoo* ne possèdent que 9 TALs dans leur génome (Gonzalez et al. 2007; Tran et al. 2018; Doucouré et al. 2018) alors que les souches asiatiques en possèdent jusqu'à 19. Les souches *Xoc* ont jusqu'à 28 effecteurs TAL dans leur génome (Lee et al. 2005; Bogdanove et al. 2011). Une souche de *X.oryzae* n'utilisera cependant pas tout son répertoire TAL pour coloniser la plante hôte qui peut porter les mêmes allèles d'un gène cible. Seuls un ou deux TAL sont transloqués dans la

cellule hôte pour causer la maladie sur des plants sensibles (Yang et White 2004). Chacun des autres TAL constitue un gène potentiel de virulence dont l'activation est dépendante de la présence du gène cible correspondant lors de l'infection des plantes.

## 5. Stratégies de déploiement d'une résistance durable contre les bactérioses du riz

Le déploiement d'une résistance durable et stable par l'introduction de gènes de résistance à large spectre dans les variétés de riz élites adoptées par les paysans, est une stratégie prometteuse pour lutter contre les maladies causées par *Xanthomonas oryzae*. Les gènes *Xa4*, *xa5*, *xa13* et *Xa21*, déployés individuellement en Asie, n'ont conféré la résistance que pendant quelques saisons de production rizicole (Vera Cruz et al. 2000; Webb et al. 2010). Ils sont par ailleurs toujours très utilisés dans les programmes de sélection du riz en Asie (Khan et al. 2014).

Notre étude montre que les gènes *Xa1*, *Xa3* et *Xa4* pris individuellement contrôlent un grand nombre des races *Xoo* caractérisées au Mali. Nous n'avons pas testé les lignées pyramidées disponibles mais les résultats obtenus en Inde et aux Philippines sont très encourageants. En effet, Lore et al. (2011) rapportaient après une analyse d'évaluation de la résistance des gènes *Xa* connus, que le pyramidage de plusieurs gènes est une stratégie efficace pour lutter contre le BB alors que lorsqu'ils sont pris individuellement ce n'est pas le cas. En guise d'exemple, les variétés portant les combinaisons de gènes *Xa7* et *Xa21* (Zhang et al. 2006), *xa5*, *xa13* et *Xa21* (Sundaram et al. 2009) ou *Xa4*, *xa5*, *xa13* et *Xa21* (Shanti et al. 2010) montrent des niveaux de résistance élevée aux populations de *Xoo*.

Au cours de nos travaux, cinq gènes R ont été identifiés sur le chromosome 4 des accessions 3K (chapitre5). La fonction de ces gènes reste à valider. Il serait ensuite intéressant de les introgresser dans les variétés élites cultivées au Mali pour un déploiement durable dans les grands centres de production rizicole du pays.

Le diagramme de Venn obtenu sur les accessions de riz portant les allèles R, donne la liste des variétés possédant les cinq gènes R dans leurs génomes. Ces variétés pourraient être utilisées dans un programme de sélection de résistance variétale assistée par marqueurs. Les variétés élites portant des gènes de résistance efficaces sont souvent uniformément déployées sur de vastes zones de production afin de maximiser la valeur ajoutée des gènes R utilisés (Dossa et al. 2015) avec pour conséquence que les variétés possédant ces gènes de résistance coévoluent avec les populations d'agents pathogènes virulents qui persistent dans l'environnement à basse fréquence. Une coévolution peut favoriser la taille de la population du pathogène sélectionné et peut amener à une expansion des souches contournant la résistance déployée. Ce type de déploiement pourrait-être le facteur principal compromettant la durabilité de la résistance (Dossa et al. 2015). Ceci peut expliquer par exemple la

réémergence de la panachure jaune du riz suite au déploiement du gène de résistance *rymv1* (Albar et al. 2003) dans les centres de riziculture en Afrique dans les années 2005.

Maintenir la durabilité en prévenant les épidémies de maladies nécessite une fine connaissance de la diversité, l'évolution et la dynamique des agents pathogènes (Midha et al. 2017). Une surveillance épidémiologique des agents pathogènes intégrant les connaissances actuelles en biologie des effecteurs, apparaît comme étant un paramètre essentiel pour favoriser le déploiement de la résistance en connaissance de cause (Dossa et al. 2015). Il est aussi essentiel que les informations sur la diversité de la structure des pathogènes et sur les gènes R soient mises à la disposition des sélectionneurs afin que les programmes de croisement soient adaptés aux conditions du milieu.

Les systèmes d'information géographique (SIG) pourraient être utilisés pour recueillir, stocker, traiter, analyser, gérer et présenter les données spatiales et géographiques associées aux deux bactérioses (BB, BLS) au Mali. Des modèles de prévision des maladies pourraient alors être développés, complétés par des enquêtes de terrain pour cartographier la maladie en temps réel et sa réelle incidence sur la production.

Les programmes de déploiement de gènes R durables s'inscrivant donc sur le long terme dans les régions tropicales, comme dans le Sahel, doivent tenir compte du contexte global de changement climatique (Verdier *et al.* 2011). En effet, le changement climatique peut affecter la durabilité des gènes R et favoriser le développement des maladies (Webb *et al.* 2010 ; Muller *et al.* 2011). Une forte température combinée à une humidité élevée favorise le contournement des gènes R et le développement de *X. oryzae* (Webb *et al.* 2010).

L'identification et le déploiement de la résistance contre *Xoo* et *Xoc* peuvent être également améliorés sur la base des connaissances apportées sur le mécanisme d'action des effecteurs TAL et de leurs gènes cibles. En effet, neuf gènes R de type *Xa* ont été clonés et codent pour des protéines diverses (Liu et al. 2014). Ces gènes R sont dépendants des effecteurs TAL, et 3 des 4 gènes récessifs clonés résultent d'une perte de sensibilité. Les gènes de sensibilité sont essentiels au développement de la maladie, et en tant que cibles des TAL, ils sont fortement induits et peuvent être prédits. Partant de ces connaissances, deux approches adaptées sont validées pour l'identification de nouvelles sources à large spectre de résistance contre *Xoo* et *Xoc*. Notamment, 1. le crible des promoteurs des gènes S majeurs pour identifier des allèles R par perte de sensibilité, et 2. l'utilisation des TALs (comme sondes) pour identifier la résistance basée sur des approches transcriptomiques (Strauß et al. 2012).

La première approche est basée sur les variations des séquences cibles des effecteurs TAL aux seins des promoteurs des gènes de sensibilité. Elle offre l'avantage de mettre en évidence des allèles de perte de sensibilité par un simple crible moléculaire (Ex : séquençage d'amplicons). Dans une expérience pilote, Hutin *et al.* (2015) ont criblé 169 accessions de riz pour rechercher un polymorphisme dans les séquences nucléotidiques du promoteur du gène majeur OsSWEET14, principal gène de sensibilité au flétrissement bactérien, qui code un

transporteur de sucre ciblé par de nombreuses souches de *Xoo*. Ce travail a été concluant ; ils ont identifié un allèle avec une délétion de 18 pb chevauchant les sites de liaison ciblés par plusieurs effecteurs TAL connus pour activer le gène S. La perte de sensibilité de l'allèle (gène R) a été validée et appelé *xa41(t)*. Les bases de données des séquences génomiques disponibles sur le riz, telles que les ressources SNPseek sur 3000 génomes de riz (Alexandrov *et al.* 2015), HapRice (Yonemaru *et al.* 2014) et RiceVarMap (Zhao *et al.* 2015) constituent des outils importants pour l'identification des polymorphismes, d'autant plus que d'autres gènes S majeurs ont été rapportés, *Os8N3* et *OsSWEET13*, et sont induits par les souches asiatiques de *Xoo* (Yang *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2015).

La seconde approche pour identifier de nouvelles sources de résistance contre BB est associée au mécanisme d'activation transcriptionnel des gènes cibles par les effecteurs TAL correspondants. Les systèmes immunitaires des plantes hôtes ont tiré parti de ce mécanisme de transcription en faisant évoluer les EBEs en amont des gènes de résistance. Ces gènes R ont un schéma d'expression caractéristique dans lequel leurs transcrits ne sont détectables qu'en présence de l'effecteur TAL correspondant. En guise d'exemple, les gènes *Bs3* du poivre et *Xa27* du riz sont activés par la transcription assurée par les TALs correspondants. Ainsi, après l'identification du TAL d'avirulence, les analyses transcriptomiques peuvent faciliter la caractérisation du gène R correspondant. Dans une expérience pilote, Strauß *et al.* (2012) ont utilisé la méthode RNA-seq pour identifier le gène R *Bs4C* du poivron qui médie la reconnaissance d'AvrBs4, la protéine d'avirulence de *Xanthomonas*.

Basée sur les connaissances actuelles des mécanismes d'activation des gènes cibles par les TALs, l'ingénierie génétique constitue une réelle opportunité pour créer de la résistance à large spectre contre les populations de *Xoo* et *Xoc*. En effet, les techniques d'édition du génome basées sur les approches TALENs ou CRISPR-Cas9 peuvent être utilisées pour modifier les séquences nucléotidiques d'un EBE en vue de prévenir ou d'empêcher la fixation des effecteurs TAL correspondant. Cette approche a été validée sur plusieurs gènes S de la famille SWEET, en créant une perte de sensibilité chez les lignées éditées sans pour autant affecter les autres traits de développement de la plante (Li *et al.* 2012). Une alternative, inspirée des stratégies mises en place par les plantes pour « piéger » les TALs par l'induction des gènes EBE, est l'ingénierie de promoteurs synthétiques pièges ou « promoter trap » placés en amont des gènes R (Boch *et al.* 2014). Le clonage de *Xa27* en aval de six EBE ciblés par des effecteurs TAL de *Xoo* et *Xoc* a conféré la résistance aux deux pathovars *Xoo* et *Xoc* (Hummel *et al.* 2012). De même, pour générer une résistance durable et à large spectre à *Xoo*, le gène R, *Xa10*, placé en aval d'un promoteur contenant 5 EBE agencés en tandem, et ciblées par AvrXa10, AvrXa27, PthXo1, PthXo6 et PthXo7, a conféré la résistance à 27 souches de *Xoo* sur les 28 testées (Zeng *et al.* 2015). Le gène R, *Xa10* modifié, est spécifiquement induit par les souches *Xoo* qui hébergent les effecteurs TAL correspondants et confère une résistance dépendante de ces derniers aux agents pathogènes à tous les stades de développement du riz. La seule souche, originaire d'Afrique, qui a contourné cette résistance, ne portait pas d'effecteur TAL correspondant aux EBE ciblés (Zeng *et al.* 2015).

Dans ma thèse je n'ai pas exploité les opportunités qu'offrent l'ingénierie des TALs et des gènes cibles, parce qu'en général, ces études relèvent du génie génétique et les produits constituent depuis peu des organismes génétiquement modifiés (OGM). La législation de notre pays n'a pas encore autorisé l'exploitation de ces organismes génétiquement modifiés.

## Conclusion générale et perspectives

### 1. Conclusion générale :

Déployer des sources de résistance durables et à large spectre contre les maladies du riz sont essentielles pour réduire les pertes et accroître la production pour nourrir des populations humaines croissantes. Ce déploiement nécessite une fine connaissance de la structure des populations pathogènes dans les paysages rizicoles. Nous avons constitué une large collection de souches de *Xoo* et *Xoc* au Mali ce qui nous a permis de mettre à jour les informations sur la structure des populations dans les principales régions rizicoles. Nous avons ensuite utilisé différentes populations génétiques de riz, NILs/IRBBs, variétés locales, MAGIC *indica* et les accessions 3K, pour identifier de nouvelles sources de résistance efficaces, durables et à large spectre contre BB et BLS.

La récente émergence du BB et BLS au Mali, nous a amené, lors de nos différentes prospections, à constituer une importante collection de *Xoo* et *Xoc*, agents pathogènes responsables des deux maladies dans nos régions rizicoles. Les 41 nouveaux isolats de *Xoo*, tous virulents sur la lignée sensible Azucena, se répartissent en 7 races dont six nouvelles (A4 à A9) selon leurs profils de virulence sur les 12 lignées IRBBs testées. Pouvant contourner tous les gènes R de type *Xa* testés, la race A9 est la plus virulente. Le contrôle de ces souches est un défi pour l'amélioration de la résistance variétale du riz au Mali. Le pyramidage des gènes de résistance que nous avons identifié comme les plus efficaces, *Xa1*, *Xa3*, et *Xa4*, dans une variété cultivée au Mali pourrait être une solution pour contrôler la maladie.

Parallèlement et pour contrôler durablement les populations des deux maladies, BB et BLS, un panel de 29 variétés cultivées a été testé avec l'ensemble des isolats de la collection malienne de *X. oryzae*. Une résistance à large spectre, très efficace contre les souches testées, y compris ceux de la race A9, a été identifiée dans deux variétés de riz, SK20-28 et son parent Giganté.

Pour caractériser cette nouvelle source de résistance (de type BRS) dont le profil est différent de ceux des gènes *Xa* connus et testés dans cette étude, les génomes des variétés SK20-28 et de ses deux parents, Giganté et Kogoni 91-1, ont été séquencés puis utilisés dans une étude GWAS avec 360 lignées MAGIC *indica*. Le choix de cette population de riz MAGIC repose sur le fait que la majorité des variétés élités cultivées au Mali appartiennent au groupe *indica* (SK20-28 et ses deux parents également). Plusieurs souches originaires d'Afrique et d'Asie de *Xoo* et *Xoc*, représentant respectivement les races de *Xoo* ainsi que les pathotypes de *Xoc* ont été utilisées pour cribler les lignées AIL MAGIC dans des conditions contrôlées et en milieu réel. Un accent particulier a été mis sur les souches de *Xoo* et *Xoc* du Mali pour augmenter la probabilité de mettre en évidence un locus (ou des loci) associé (s) à la résistance de SK20-28. Un total de 11 BSR et trois QTL spécifiques aux souches ont été identifiés. Des

allèles uniques associés à la résistance et à la sensibilité ont été localisés dans trois QTL BSR. Les allèles R candidats ont été mappés sur les génomes de SK20-28 et ses parents. Aucune association n'a cependant été établie entre ces candidats et la résistance de SK20-28.

Les variétés SK20-28 et ses parents ont été utilisées dans une seconde analyse de GWAS impliquant 258 accessions du projet 3K. A la suite de ces travaux, un QTL à large spectre de résistance contre les deux pathovars, a été caractérisé sur le chromosome 4 du riz. Sur la base de **l'utilisation du genome de référence MSU v7 de Nipponbare**, cinq loci associés à la résistance contre les deux pathovars ont été identifiés, parmi lesquels, Os04g53120 et Os04g53160 étaient les plus significativement prometteurs. Deux de ces loci ont été précédemment validés comme étant des gènes R de type *Xa* contre BB, notamment, *Xa1* (Os04g53120) et *Xa38* (LOC\_Os04g53050). La forte hétérozygotie observée dans les deux gènes candidats majeurs (Os04g53120 et Os04g53160) s'expliquerait par la forte couverture des reads le long de ces gènes, suggérant une répétition en tandem de ces gènes NBS-LRR dans les accessions résistantes.

Pour approfondir nos connaissances sur ces gènes R candidats, nous avons repris les analyses sur la **base du genome de Carolina Gold** connu pour sa résistance aux deux pathovars. L'analyse de la profondeur des reads sur le long du gène *Xa1* (Os04g53120) a révélé deux caractéristiques essentielles chez les accessions résistantes, 1. sa région promotrice porte une délétion dans l'EBE de Tal E, 2. son extrémité 3' terminale correspondant au domaine LRR de la protéine est suffisamment bien couverte. Ces deux caractéristiques semblent être fortement associées à l'élargissement du spectre de la résistance du gène. Ce variant de *Xa1* gouvernerait également la résistance de SK20-28 et son parent Giganté contre les deux pathovars au Mali. Les gènes candidats seraient également des cibles des effecteurs Tals.

Les données acquises à la fois sur la structure en race des populations de *Xoo* et en pathotypes de *Xoc* au Mali ainsi que les sources de résistance du riz identifiées contre ces populations d'agents pathogènes, constituent une information essentielle pour la mise en place d'un programme d'amélioration de la résistance au BB et BLS au Mali, ce qui devrait contribuer à réduire les pertes occasionnées par ces pathogènes.

## 2. Perspectives:

Comprendre les processus qui ont façonné l'évolution des populations de *Xoo* et *Xoc* dans les paysages rizicoles est un des éléments clés pour définir des stratégies de gestion appropriées et soutenir les efforts d'amélioration variétale du riz au Mali. Ainsi, comprendre l'origine des agents pathogènes est très important pour appréhender leur évolution en milieu réel. Plusieurs auteurs ont spéculé sur l'origine des populations asiatiques de *Xoo* et de *Xoc* sur la base des analyses génomiques et de clustering des souches. A ce jour, il est établi que les souches asiatiques de *Xoo* se distinguent de celles d'Afrique. Cependant, les connaissances

acquises sur les populations africaines de *X.oryzae* n'ont pas encore permis d'identifier leur berceau d'origine. Sur la base des données génomiques assez robustes du riz Africain, une équipe de l'IRD a tout récemment identifié le delta intérieur du fleuve Niger comme étant le berceau du riz *glaberrima*. Dans cette région et autour de Mopti la riziculture date de plusieurs milliers d'années. Le riz *glaberrima* y a été domestiqué il y a plus de 3500 ans et sa distribution s'est étendue dans plusieurs régions d'Afrique avec une collection de plusieurs milliers d'accessions au Mali. Le gène de résistance *Xa21* a été isolé en 1990 par les chercheurs de l'IRRI à partir d'une accession d'*Oryza longistaminata* collectée au Mali en 1977 dans le delta intérieur du Niger par un chercheur du CRRRI (Central Rice Research Institute ou Institut Central de Recherche sur le Riz) / Inde <https://www.grain.org/en/article/52-bb-rice-irri-s-first-transgenic-field-test>.

Cette source de résistance contre le BB, identifiée dans le delta intérieur du Niger suggère que le BB et son hôte ont pu coévoluer (ou coexister) dans le temps. Il est alors probable que le delta intérieur du Niger soit également le berceau des populations africaines de *Xoo* et *Xoc*. Il n'est cependant pas exclu que des échanges ou contacts avec les populations asiatiques de *Xoo* et *Xoc* aient pu se produire compte tenu de la forte utilisation des lignées *indica* et *japonica* au Mali et en Afrique en général. Pour étudier cette hypothèse sur l'origine des *X.oryzae* en Afrique, il serait intéressant d'étendre les missions de collecte au delta intérieur du Niger.

Pour contrôler les deux maladies, BB et BLS, une source de résistance très efficace a été identifiée dans les variétés SK20-28 et Giganté. Cette résistance peut s'expliquer par un variant du gène *R Xa1* portant une délétion dans son promoteur et une extrémité 3' terminale bien couverte. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons développé une population de cartographie à partir du croisement SK20-28 et la lignée sensible témoin IR24. 250 plants de la génération F2 seront testés pour leur résistance/sensibilité et séquencés par GBS (Genotyping By Sequencing) pour confirmer ou identifier le (S) gène (s) responsable (s) de la résistance des deux variétés.

Enfin, la validation des gènes candidats identifiés sur les MAGIC *indica*, est en cours chez nos partenaires à l'université du Colorado. Pour valider les allèles R candidats identifiés sur les accessions *indica* du projet 3K, une prédiction bio-informatique a été faite sur les 1770 accessions *indica* pour mettre en évidence les accessions porteuses des allèles R. Le test de résistance de ces accessions obtenues auprès de l'IRRI confirmera ou pas la pertinence du choix des allèles R retenus comme candidat à la résistance contre BB et BLS. L'implication des effecteurs TAL, notamment TalE, TalB, TalF et TalH dans la virulence des souches testées sera également validée en collaboration avec l'IRD de Montpellier. Toutes ces études seront conduites dans le cadre d'un programme d'amélioration de la résistance variétale du riz au Mali contre BB et BLS à développer avec nos partenaires (IRD et IER notamment).

## Annexe

### Publications Cheick Tekete

1. Wonni I, Cottyn B, Detemmerman L, Dao S, Ouedraogo L, Sarra S, **Tekete C**, Poussier S, Corral R, Triplett L, Koita O, Koebnik R, Leach J, Szurek B, Maes M, Verdier V. (2014). Analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* population in Mali and Burkina Faso reveals a high level of genetic and pathogenic diversity. *Phytopathology*. 104(5): 520-531.
2. Kone D, Dao S, **Tekete C**, Doumbia I, Koita O, Abo K, Wicker E, Verdier V. (2015). Confirmation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing Cassava Bacterial Blight in Ivory Coast. *Plant Disease*, 99 (10)
3. Poulin L, Grygiel P, Magne M, Gagnevin L, Rodriguez-R LM, Forero Serna N, Zhao S, El Ralii M, Dao S, **Tekete C**, Wonni I, Koita O, Pruvost O, Verdier V, Vernière C, Koebnik R. (2015). New multilocus variable-number tandem-repeat analysis tool for surveillance and local epidemiology of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak of rice caused by *Xanthomonas*. *Appl Environ Microbiol*. 181(2): 688-98
4. Sangare M., **Tekete C.**, O. K. Bagui, A. Ba & J. T. Zoueu. (2015). Identification of Bacterial Diseases in Rice Plants Leaves by the Use of Spectroscopic Imaging; Canadian Center of Science and Education; Applied Physics Research; Vol. 7, No. 6; <http://dx.doi.org/10.5539/apr.v7n6p61>
5. Wonni I, Ouedraogo L, Dao S, **Tekete C**, Koita O, Taghouti G, Portier P, Szurek B, Verdier V (2015). First report of cassava bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Burkina Faso. *Plant Disease* **99**: 551. doi: PDIS-03-14-0302-PDN.
6. Triplett LR, Cohen SP, Heffelfinger C, Schmidt CL, Huerta A, **Tekete C**, Verdier V, Bogdanove AJ, Leach JE (2016). A resistance locus in the American heirloom rice variety Carolina Gold Select is triggered by TAL effectors with diverse predicted targets and is effective against African strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant J*. 87 (5): 472-483. doi: 10.1111/tpj.13212.
7. Bossa-Castro A, **Tekete C**, Raghavan C, Delorean E, Dereeper A, Dagno K, Koita O, Mosquera G, Leung H, Verdier V, Leach J. (2018). Allelic variation for broad-spectrum resistance and susceptibility to bacterial pathogens identified in a rice MAGIC population. *Plant Biotechnol J*. 16(9): 1559-1568. DOI:10.1111/pbi.12895

8. Doucouré H, Pérez-Quintero AL, Reshetnyak G, **Tekete C**, Auguy F, Thomas E, Koebnik R, Szurek B, Koita O, Verdier V, Cunnac S. (2018) Functional and Genome Sequence-Driven Characterization of tal Effector Gene Repertoires Reveals Novel Variants With Altered Specificities in Closely Related Malian *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains. *Front. Microbiol.* 9:1657. doi: 10.3389/fmicb.2018.01657
9. **Tekete C**, Cunnac S, Doucouré H, Dembele M, Keita I, Sarra S, Karim D, Koita O, Verdier V. (2019). Characterization of new races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Mali informs Resistance gene deployment. *Phytopathology* DOI:10.1094/PHYTO-02-19-0070-R
10. Tall, H, **Tékété C**, Noba K, Koita O, Cunnac S, Hutin M, Szurek B, Verdier V. (2019). Confirmation Report of Bacterial Blight Caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on Rice in Senegal. *Plant Disease*, novembre, PDIS-07-19-1464-PDN. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1464-PDN>.

## 2. Poster avec publication dans revue

1. Doucouré H, Auguy F, **Tekete C**, Hutin M, Baufumé S, Koebnik, R, Szurek, B, **Koita, O**, Verdier, V, Cunnac, S. (2015). Engineering Broad Resistance Tailored against Rice Bacterial Leaf Blight in Mali. *Phytopathology* 105(Suppl. 4):S4.37
2. **Tekete C**, Doucoure H, Dembele M, Doumbia M, Dao S, Dagno K, Sarra S, Cunnac S, Koita O, Verdier V. (2015). Identifying *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains and adapted sources of resistance among rice breeding lines in Mali. *Phytopathology* 105 (Suppl. 4):S4.136
3. Tall H, Noba K, Szurek B, Cunnac S, **Tekete C**, Verdier VM. (2017). Report and characterization of bacterial diseases caused by *Xanthomonas oryzae* in Senegal. *Phytopathology*. 107(2): 101-101 S.

## 3. Communications

1. **Tekete C**, Dao S, Dembele M, Sarra S, Verdier V, Koita O, Agbangla C. (2012). Caractérisation des *Xanthomonas oryzae* pathogènes du riz au Mali. 6ème Symposium Malien sur les Sciences Appliquées, MSAS 2012- Bamako 26- 29 décembre 2012.

2. Dao S, Dembele M, **Tekete C**, Koita O, Verdier V, Sarra S. (2013). Caractérisation moléculaire des souches du flétrissement bactérien (BB) et de la strie bactérienne (BLS) du riz au Mali. Third Africa Rice Congress. Yaoundé, Cameroun, 21-24 octobre.
3. **Tekete C**, Dao S, Dembele M, Sarra S, Verdier V, Koita O. (2013). Identification de sources de résistance aux souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dans les variétés de riz cultivées au Mali. Poster présenté au 3<sup>ème</sup> congrès du riz pour l'Afrique qui s'est tenu du 21 au 24 octobre à Yaoundé au Cameroun
4. Bossa-Castro A, Delorean E, Raghavan C, **Tekete C**, Dereeper A., Dagno K, Koita O, Mosquera G, Leung H, Verdier V, Leach J. (2016). Durable and broad spectrum disease resistance to bacterial blight and bacterial leaf streak of rice. IS-MPMI XVII Congress, Portland, Oregon, U.S.A., July 17-21
5. Bossa-Castro A, Raghavan C, **Tekete C**, Delorean E, Dereeper A, Dagno K, Koita O, Mosquera G, Leung H, Verdier V, Leach J. (2016). Identification of a rice locus conferring broad spectrum disease resistance to bacterial pathogens. IS-MPMI XVII Congress, Portland, Oregon, U.S.A., July 17-21
6. Doucouré H, Auguy, F, **Tekete C**, Baufumé S, Koebnik R, Szurek B, Koita O, Verdier V, Cunnac, S. (2016). Engineering broad resistance tailored against rice bacterial blight in West Africa. 14<sup>th</sup> International Symposium on Rice Functional Genomics, September 26-28<sup>th</sup>, le Corum-Montpellier, France
7. **Tekete C**, ....(2016). Identifying *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains and adapted sources of resistance among rice breeding lines in Mali. 12<sup>èmes</sup> Rencontres Plantes-Bactéries, Centre Paul Langevin, Aussois, Savoie, **11-15 janvier**.
8. Tall H, K Noba, Szurek B, Cunnac S, **Tekete C**, Verdier V . (2017). Report and characterization of bacterial diseases caused by *Xanthomonas oryzae* in Senegal. 12<sup>th</sup> EFPP&10<sup>th</sup> SFP International Conference, Malo les bains, Dunkerque, France, May 29 - June 2 2017
9. Bossa-Castro AM, **Tekete C**, Raghavan C, Delorea E, Dereeper A, Verdier V, Dagno K, Koita O, Mosquera GM, Leung H, Leach JE. (2018). Broad-spectrum resistance and susceptibility to bacterial blight and bacterial leaf streak of rice. International Conference Plant Pathology, ICPP 2018. Plant health in a global economy, Boston, July 29th- August 3rd 2018.
10. Leach JE, Ana M. Bossa-Castro AM, Huerta AI, Delorean E, Raghavan C, **Tekete C**, Dereeper A, Tonnessen BW, Koita O, Mosquera GM, Leung H, Verdier V. (2018).

Quantitative resistance to bacterial pathogens of rice. International Conference Plant Pathology, ICPP 2018. Plant health in a global economy, Boston, July 29<sup>th</sup>- August 3<sup>rd</sup> 2018.

11. Tall H, Noba K, Szurek B, Cunnac S, **Tekete C**, Verdier V. (2018). Report and characterization of bacterial diseases caused by *Xanthomonas oryzae* in Senegal. International Conference Plant Pathology, ICPP 2018. Plant health in a global economy, Boston, July 29<sup>th</sup>- August 3<sup>rd</sup> 2018.
12. Tall H, Noba K, Szurek B, Cunnac S, **Tekete C**, Verdier V. (2018). Report and characterization of bacterial diseases caused by *Xanthomonas oryzae* in Senegal. 13<sup>èmes</sup> Rencontres Plantes-Bactéries – Aussois, 29 janvier – 2 février 2018
13. **Tekete C**, Doucouré H, Keita I, Dagno K, Dembele M, Sarra S, Dolo M, Cunnac S, Koita O, Verdier V. (2018). De la caractérisation des races de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* à l'identification des gènes de résistance pour le contrôle du flétrissement bactérien du riz au Mali. 13<sup>èmes</sup> Rencontres Plantes-Bactéries – Aussois, 29 janvier – 2 février 2018

#### 4. Autres

1. Dao S, **Tekete C**, Dembele M, Sarra S, Verdier V, Koita O. (2013). Contribution à l'amélioration de la résistance du riz aux *Xanthomonas oryzae* au Mali, Mémoire de Sognan Dao, 60p

## References bibliographiques de la thèse

- Abramovitch, R B., J C. Anderson, and G B. Martin. 2006. "Bacterial Elicitation and Evasion of Plant Innate Immunity." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (8): 601–11. <https://doi.org/10.1038/nrm1984>.
- Adhikari, T. B., T. W. Mew, and J. E. Leach. 1999. "Genotypic and Pathotypic Diversity in *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* in Nepal." *Phytopathology* 89 (8): 687–94. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.8.687>.
- Adhikari, T B, C M Vera Cruz, Q Zhang, R J Nelson, D Z Skinner, T W Mew, and J E Leach. 1995. "Genetic Diversity of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* in Asia." *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 61: 6.
- Afolabi, O., R. Amoussa, M. Bilé, A. Oludare, V. Gbogbo, L. Poulin, R. Koebnik, B. Szurek, and D. Silué. 2015. "First Report of Bacterial Leaf Blight of Rice Caused by *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* in Benin." *Plant Disease* 100 (2): 515–515. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0821-PDN>.
- Afolabi, O., B. Milan, R. Amoussa, R. Koebnik, L. Poulin, B. Szurek, G. Habarugira, J. Bigirimana, and D. Silue. 2014. "First Report of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola* Causing Bacterial Leaf Streak of Rice in Burundi." *Plant Disease* 98 (10): 1426–1426. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0504-PDN>.
- Afolabi, O., B. Milan, L. Poulin, J. Ongom, B. Szurek, R. Koebnik, and D. Silue. 2014. "First Report of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola* Causing Bacterial Leaf Streak of Rice in Uganda." *Plant Disease* 98 (11): 1579–1579. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0745-PDN>.
- Agarwal, P. C., C. Nieves Mortensen, and S. B. Mathur. 1994. "Maladies Du Riz Transmises Par Les Semences et Tests Phytosanitaires." <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015013417>.
- Albar, L., M.-N. Ndjondjop, Z. Eshak, A. Berger, A. Pinel, M. Jones, D. Fargette, and A. Ghesquière. 2003. "Fine Genetic Mapping of a Gene Required for Rice Yellow Mottle Virus Cell-to-Cell Movement." *TAG Theoretical and Applied Genetics* 107 (2): 371–78. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1258-4>.
- Alfano, J R, and A Collmer. 1997. "The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and Death." *Journal of Bacteriology* 179 (18): 5655–62.
- Alfano, James R., and Alan Collmer. 2004. "Type III Secretion System Effector Proteins: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense." *Annual Review of Phytopathology* 42: 385–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>.

- Amante-Bordeos, A., L. A. Sitch, R. Nelson, R. D. Dalmacio, N. P. Oliva, H. Aswidinnoor, and H. Leung. 1992. "Transfer of Bacterial Blight and Blast Resistance from the Tetraploid Wild Rice *Oryza Minuta* to Cultivated Rice, *Oryza Sativa*." *Theoretical and Applied Genetics* 84 (3): 345–54. <https://doi.org/10.1007/BF00229493>.
- Antony, Ginny, Junhui Zhou, Sheng Huang, Ting Li, Bo Liu, Frank White, and Bing Yang. 2010. "Rice Xa13 Recessive Resistance to Bacterial Blight Is Defeated by Induction of the Disease Susceptibility Gene Os-11N3." *The Plant Cell* 22 (11): 3864–76. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078964>.
- Ardales, E. Y., H. Leung, C. M. Vera Cruz, T. W. Mew, J. E. Leach, and R. J. Nelson. 1996. "Hierarchical Analysis of Spatial Variation of the Rice Bacterial Blight Pathogen Across Diverse Agroecosystems in the Philippines." *Phytopathology* 86 (3): 241. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-241>.
- Ashikari, Motoyuki, and Makoto Matsuoka. 2006. "Identification, Isolation and Pyramiding of Quantitative Trait Loci for Rice Breeding." *Trends in Plant Science* 11 (7): 344–50. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.05.008>.
- Audebert, A., and M. Fofana. 2009. "Rice Yield Gap Due to Iron Toxicity in West Africa." *Journal of Agronomy and Crop Science* 195 (1): 66–76. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00339.x>.
- Balding, David J. 2006. "A Tutorial on Statistical Methods for Population Association Studies." *Nature Reviews. Genetics* 7 (10): 781–91. <https://doi.org/10.1038/nrg1916>.
- Bandillo, Nonoy, Chitra Raghavan, Pauline Andrea Muyco, Ma Anna Lynn Sevilla, Irish T. Lobina, Christine Jade Dilla-Ermita, Chih-Wei Tung, et al. 2013. "Multi-Parent Advanced Generation Inter-Cross (MAGIC) Populations in Rice: Progress and Potential for Genetics Research and Breeding." *Rice* 6 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-11>.
- Bhasin, Hemal, Dharminder Bhatia, Saurabh Raghuvanshi, Jagjit S. Lore, Gurpreet K. Sahi, Baljit Kaur, Yogesh Vikal, and Kuldeep Singh. 2012. "New PCR-Based Sequence-Tagged Site Marker for Bacterial Blight Resistance Gene *Xa38* of Rice." *Molecular Breeding* 30 (1): 607–11. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9646-y>.
- Biek, R, Oliver G. Pybus, James O. Lloyd-Smith, and Xavier Didelot. 2015. "Measurably Evolving Pathogens in the Genomic Era." *Trends in Ecology & Evolution* 30 (6): 306–13. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.03.009>.
- Blair, M W., A J. Garris, A S. Iyer, B Chapman, S Kresovich, and S R. McCouch. 2003. "High Resolution Genetic Mapping and Candidate Gene Identification at the Xa5 Locus for Bacterial Blight Resistance in Rice (*Oryza Sativa* L.)." *Theoretical and Applied Genetics* 107 (1): 62–73. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1231-2>.

Block, Anna, Guangyong Li, Zheng Qing Fu, and James R Alfano. 2008. "Phytopathogen Type III Effector Weaponry and Their Plant Targets." *Current Opinion in Plant Biology, Biotic Interactions*, 11 (4): 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.007>.

Boch, J, and U Bonas. 2010. "Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function." *Annual Review of Phytopathology* 48 (1): 419–36. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>.

Boch, J, U Bonas, and T Lahaye. 2014. "TAL Effectors – Pathogen Strategies and Plant Resistance Engineering." *New Phytologist* 204 (4): 823–32. <https://doi.org/10.1111/nph.13015>.

Boch, J, H Scholze, S Schornack, A Landgraf, S Hahn, S Kay, T Lahaye, A Nickstadt, and U Bonas. 2009. "Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors." *Science* 326 (5959): 1509–12. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>.

Boch, Jens, and Ulla Bonas. 2010. "Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function." *Annual Review of Phytopathology* 48: 419–36. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>.

Bogdanove, A J., S V. Beer, U Bonas, C A. Boucher, A Collmer, D L. Coplin, G R. Cornelis, et al. 1996. "Unified Nomenclature for Broadly Conserved Hrp Genes of Phytopathogenic Bacteria." *Molecular Microbiology* 20 (3): 681–83. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5731077.x>.

Bogdanove, A J., R Koebnik, H Lu, A Furutani, S V. Angiuoli, P B. Patil, M-A V Sluys, et al. 2011. "Two New Complete Genome Sequences Offer Insight into Host and Tissue Specificity of Plant Pathogenic Xanthomonas Spp." *Journal of Bacteriology*, July, JB.05262-11. <https://doi.org/10.1128/JB.05262-11>.

Bogdanove, A J, S Schornack, and T Lahaye. 2010. "TAL Effectors: Finding Plant Genes for Disease and Defense." *Current Opinion in Plant Biology* 13 (4): 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.010>.

Bogdanove, Adam J., Sebastian Schornack, and Thomas Lahaye. 2010. "TAL Effectors: Finding Plant Genes for Disease and Defense." *Current Opinion in Plant Biology* 13 (4): 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.010>.

Boman, H. G. 2003. "Antibacterial Peptides: Basic Facts and Emerging Concepts." *Journal of Internal Medicine* 254 (3): 197–215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x>.

Bonas, U., R. E. Stall, and B. Staskawicz. 1989. "Genetic and Structural Characterization of the Avirulence Gene AvrBs3 from Xanthomonas Campestris Pv. Vesicatoria." *Molecular & General Genetics: MGG* 218 (1): 127–36.

Bradbury, J. F. 1984. "Xanthomonas." *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20057029462>.

Buddenhagen, I. W., H. H. Vuong, and D. D. Ba. 1979. "Bacterial Blight Found in Africa." *International Rice Research Newsletter* 4 (1). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801367355>.

Burdon, J J, and P H Thrall. 2008. "Pathogen Evolution across the Agro-Ecological Interface: Implications for Disease Management." *Evolutionary Applications* 1 (1): 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00005.x>.

Busungu, C, S Taura, J I Sakagami, T Anai, and K Ichitani. 2018. "High-Resolution Mapping and Characterization of Xa42, a Resistance Gene against Multiple Xanthomonas Oryzae Pv. Oryzae Races in Rice (Oryza Sativa L.)." *Breeding Science* 68 (2): 188–99. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.17094>.

Busungu, C, S Taura, J I Sakagami, and K Ichitani. 2016. "Identification and Linkage Analysis of a New Rice Bacterial Blight Resistance Gene from XM14, a Mutant Line from IR24." *Breeding Science* 66 (4): 636–45. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16062>.

Büttner, Daniela, and Ulla Bonas. 2002. "Port of Entry – the Type III Secretion Translocon." *Trends in Microbiology* 10 (4): 186–92. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02331-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02331-4).

———. 2010. "Regulation and Secretion of Xanthomonas Virulence Factors." *FEMS Microbiology Reviews* 34 (2): 107–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x>.

Büttner, Daniela, Doreen Gürlebeck, Laurent D. Noël, and Ulla Bonas. 2004. "HpaB from Xanthomonas Campestris Pv. Vesicatoria Acts as an Exit Control Protein in Type III-Dependent Protein Secretion." *Molecular Microbiology* 54 (3): 755–68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04302.x>.

Büttner, Daniela, and Sheng Yang He. 2009. "Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria." *Plant Physiology* 150 (4): 1656–64. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139089>.

Cao, Yinglong, Xinhua Ding, Meng Cai, Jing Zhao, Yongjun Lin, Xianghua Li, Caiguo Xu, and Shiping Wang. 2007. "The Expression Pattern of a Rice Disease Resistance Gene Xa3/Xa26 Is Differentially Regulated by the Genetic Backgrounds and Developmental Stages That Influence Its Function." *Genetics* 177 (1): 523–33. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.075176>.

Carvalho, André de Oliveira, and Valdirene Moreira Gomes. 2009. "Plant Defensins—Prospects for the Biological Functions and Biotechnological Properties." *Peptides* 30 (5): 1007–20. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.01.018>.

Cerutti, Aude, Alain Jauneau, Marie-Christine Auriac, Emmanuelle Lauber, Yves Martinez, Serge Chiarenza, Nathalie Leonhardt, Richard Berthomé, and Laurent D. Noël. 2017. "Immunity at Cauliflower Hydathodes Controls Systemic Infection by Xanthomonas

Campestris Pv Campestris.” *Plant Physiology* 174 (2): 700–716. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01852>.

Cheema, Kuljit K., Navjit K. Grewal, Yogesh Vikal, Rajiv Sharma, Jagjeet S. Lore, Aparna Das, Dharminder Bhatia, et al. 2008. “A Novel Bacterial Blight Resistance Gene from *Oryza Nivara* Mapped to 38 Kb Region on Chromosome 4L and Transferred to *Oryza Sativa* L.” *Genetics Research* 90 (5): 397–407. <https://doi.org/10.1017/S0016672308009786>.

Chen, C-H, W Zheng, X-M Huang, D-P Zhang, and X-H Lin. 2006. “Major QTL Conferring Resistance to Rice Bacterial Leaf Streak.” *Agricultural Sciences in China* 5 (3): 216–20. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(06\)60041-2](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(06)60041-2).

Chen, H-H, and Y Sato. 2005. “The Map-Based Sequence of the Rice Genome International Rice Genome Sequencing Project Nature 2005 436 793 800.” *Nature* 436 (August).

Chen, Li-Qing. 2014. “SWEET Sugar Transporters for Phloem Transport and Pathogen Nutrition.” *New Phytologist* 201 (4): 1150–55. <https://doi.org/10.1111/nph.12445>.

Chen, L-Q, B-H Hou, S Lalonde, H Takanaga, M L. Hartung, X-Q Qu, W-J Guo, et al. 2010. “Sugar Transporters for Intercellular Exchange and Nutrition of Pathogens.” *Nature* 468 (7323): 527–32. <https://doi.org/10.1038/nature09606>.

Chen, L-Q, X-Q Qu, B-H Hou, D Sosso, S Osorio, A R. Fernie, and W B. Frommer. 2012. “Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport.” *Science* 335 (6065): 207–11. <https://doi.org/10.1126/science.1213351>.

Chen, S, Z Huang, L Zeng, J Yang, Q Liu, and X Zhu. 2008. “High-Resolution Mapping and Gene Prediction of Emphasis *Xanthomonas Oryzae* Emphasis Pv. Emphasis *Oryzae* Emphasis Resistance Gene Emphasis Xa7 Emphasis.” *Molecular Breeding* 22 (3): 433–41. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9187-1>.

Chien, Chih-Cheng, Mei-Yi Chou, Chun-Yi Chen, and Ming-Che Shih. 2019. “Analysis of Genetic Diversity of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Populations in Taiwan.” *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36575-x>.

Chisholm, Stephen T., Gitta Coaker, Brad Day, and Brian J. Staskawicz. 2006. “Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response.” *Cell* 124 (4): 803–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>.

Choi, Min-Seon, Wooki Kim, Chanhui Lee, and Chang-Sik Oh. 2013. “Harpins, Multifunctional Proteins Secreted by Gram-Negative Plant-Pathogenic Bacteria.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26 (10): 1115–22. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0050-CR>.

Chu, Zhaohui, Binying Fu, Hong Yang, Caiguo Xu, Zhikang Li, A. Sanchez, Y. J. Park, J. L. Bennetzen, Qifa Zhang, and Shiping Wang. 2006. “Targeting Xa13, a Recessive Gene for

Bacterial Blight Resistance in Rice.” *Theoretical and Applied Genetics* 112 (3): 455–61. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0145-6>.

Churchill, G. A., and R. W. Doerge. 1994. “Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping.” *Genetics* 138 (3): 963–71.

Cubry, Philippe, Christine Tranchant-Dubreuil, Anne-Céline Thuillet, Cécile Monat, Marie-Noëlle Ndjiondjop, Karine Labadie, Corinne Cruaud, et al. 2018a. “The Rise and Fall of African Rice Cultivation Revealed by Analysis of 246 New Genomes.” *Current Biology* 28 (14): 2274–2282.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.066>.

———. 2018b. “The Rise and Fall of African Rice Cultivation Revealed by Analysis of 246 New Genomes.” *Current Biology: CB* 28 (14): 2274–2282.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.066>.

Curtis, Lawrence C. 1943. “Deleterious Effects of Guttated Fluids on Foliage.” *American Journal of Botany* 30 (10): 778–82. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1943.tb10330.x>.

Dai, Liang-Ying, Xiong-Lun Liu, Ying-Hui Xiao, and Guo-Liang Wang. 2007. “Recent Advances in Cloning and Characterization of Disease Resistance Genes in Rice.” *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (1): 112–19. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00413.x>.

Dangl, J. L., and J. D. Jones. 2001. “Plant Pathogens and Integrated Defence Responses to Infection.” *Nature* 411 (6839): 826–33. <https://doi.org/10.1038/35081161>.

Delledonne, Massimo, Jürgen Zeier, Adriano Marocco, and Chris Lamb. 2001. “Signal Interactions between Nitric Oxide and Reactive Oxygen Intermediates in the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (23): 13454–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.231178298>.

Deng, W L, H A Lin, Y C Shih, C C Kuo, J Y Tzeng, Li-yu D. Liu, Shu-Tzu Huang, Chi-Ming Huang, and Chia-Lin Chung. 2016. “Genotypic and Pathotypic Diversity of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Strains in Taiwan.” *Journal of Phytopathology* 164 (10): 745–59. <https://doi.org/10.1111/jph.12495>.

Dilla-Ermita, C J, E Tandayu, V M Juanillas, J Detras, D N Lozada, M S Dwiyanti, C Vera Cruz, et al. 2017. “Genome-Wide Association Analysis Tracks Bacterial Leaf Blight Resistance Loci In Rice Diverse Germplasm.” *Rice* 10 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0147-4>.

Djedatin, G, M-N Ndjiondjop, A Sanni, M Lorieux, V Verdier, and A Ghesquiere. 2016. “Identification of Novel Major and Minor QTLs Associated with *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* (African Strains) Resistance in Rice (*Oryza Sativa* L.).” *Rice* 9 (April): 18. <https://doi.org/10.1186/s12284-016-0090-9>.

Doebley, J., A. Stec, and L. Hubbard. 1997. “The Evolution of Apical Dominance in Maize.” *Nature* 386 (6624): 485–88. <https://doi.org/10.1038/386485a0>.

Dossa, Gerbert S., Adam Sparks, Casiana Vera Cruz, and Ricardo Oliva. 2015. "Decision Tools for Bacterial Blight Resistance Gene Deployment in Rice-Based Agricultural Ecosystems." *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00305>.

Doucouré, H, A. L. Pérez-Quintero, G Reshetnyak, C Tekete, F Auguy, E Thomas, R Koebnik, et al. 2018. "Functional and Genome Sequence-Driven Characterization of Tal Effector Gene Repertoires Reveals Novel Variants with Altered Specificities in Closely Related Malian *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Strains." *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01657>.

Doyle, E L., B L. Stoddard, D F. Voytas, and A J. Bogdanove. 2013. "TAL Effectors: Highly Adaptable Phytobacterial Virulence Factors and Readily Engineered DNA-Targeting Proteins." *Trends in Cell Biology* 23 (8): 390–98. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.003>.

DYE, D. W. 1978. "The Genus *Xanthomonas* Dowson 1939. In A Proposed Nomenclature and Classification for Plant Pathogenic Bacteria." *N. Z. J. Agric. Res.* 21: 153–77.

EPPO. 2017. "European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)." 2017. <https://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.

Ezuka, A. 1975. "Inheritance of Resistance of Rice Variety Wase Aikoku 3 to *Xanthomonas Oryzae*." *Bull. Tokai-Kinki Natl. Agric. Exp. Stn.* 28: 124–30.

Flor, H H. 1971. "Current Status of the Gene-For-Gene Concept." *Annual Review of Phytopathology* 9 (1): 275–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>.

Gao, Xiaoyi, Joshua Starmer, and Eden R. Martin. 2008. "A Multiple Testing Correction Method for Genetic Association Studies Using Correlated Single Nucleotide Polymorphisms." *Genetic Epidemiology* 32 (4): 361–69. <https://doi.org/10.1002/gepi.20310>.

Garris, Amanda J., Thomas H. Tai, Jason Coburn, Steve Kresovich, and Susan McCouch. 2005. "Genetic Structure and Diversity in *Oryza Sativa* L." *Genetics* 169 (3): 1631–38. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035642>.

Gómez-Gómez, Lourdes, and Thomas Boller. 2002. "Flagellin Perception: A Paradigm for Innate Immunity." *Trends in Plant Science* 7 (6): 251–56. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02261-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02261-6).

Gonzalez, C, B Szurek, C Manceau, T Mathieu, Y Séré, and V Verdier. 2007. "Molecular and Pathotypic Characterization of New *Xanthomonas Oryzae* Strains from West Africa." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (5): 534–46. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0534>.

González-Lamothe, Rocío, Gabriel Mitchell, Mariza Gattuso, Moussa Diarra, François Malouin, Kamal Bouarab, Rocío González-Lamothe, et al. 2009. "Plant Antimicrobial Agents and Their

Effects on Plant and Human Pathogens.” *International Journal of Molecular Sciences* 10 (8): 3400–3419. <https://doi.org/10.3390/ijms10083400>.

Goto, Takahiro, Tadayuki Matsumoto, Naruto Furuya, Kenichi Tsuchiya, and Atsushi Yoshimura. 2009. “Mapping of Bacterial Blight Resistance Gene Xa11 on Rice Chromosome 3.” *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 43 (3): 221–25. <https://doi.org/10.6090/jarq.43.221>.

Grau, J, M Reschke, A Erkes, J Streubel, R D. Morgan, G G. Wilson, R Koebnik, and J Boch. 2016. “AnnoTALE: Bioinformatics Tools for Identification, Annotation, and Nomenclature of TALEs from *Xanthomonas* Genomic Sequences.” *Scientific Reports* 6 (February): 21077. <https://doi.org/10.1038/srep21077>.

Gu, K, J S Sangha, Y Li, and Z Yin. 2008. “High-Resolution Genetic Mapping of Bacterial Blight Resistance Gene Xa10.” *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 116 (2): 155–63. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0655-5>.

Gu, K., D. Tian, F. Yang, L. Wu, C. Sreekala, D. Wang, G.-L. Wang, and Z. Yin. 2004. “High-Resolution Genetic Mapping of Xa27(t), a New Bacterial Blight Resistance Gene in Rice, *Oryza Sativa* L.” *Theoretical and Applied Genetics* 108 (5): 800–807. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1491-x>.

Gu, Keyu, Dongsheng Tian, Chengxiang Qiu, and Zhongchao Yin. 2009. “Transcription Activator-like Type III Effector AvrXa27 Depends on OsTFIIAgamma5 for the Activation of Xa27 Transcription in Rice That Triggers Disease Resistance to *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*.” *Molecular Plant Pathology* 10 (6): 829–35. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00567.x>.

Gu, Keyu, Bing Yang, Dongsheng Tian, Lifang Wu, Dongjiang Wang, Chellamma Sreekala, Fan Yang, et al. 2005a. “R Gene Expression Induced by a Type-III Effector Triggers Disease Resistance in Rice.” *Nature* 435 (7045): 1122–25. <https://doi.org/10.1038/nature03630>.

———. 2005b. “R Gene Expression Induced by a Type-III Effector Triggers Disease Resistance in Rice.” *Nature* 435 (7045): 1122–25. <https://doi.org/10.1038/nature03630>.

Guan, Yue-Feng, Xue-Yong Huang, Jun Zhu, Ju-Fang Gao, Hong-Xia Zhang, and Zhong-Nan Yang. 2008. “RUPTURED POLLEN GRAIN1, a Member of the MtN3/Saliva Gene Family, Is Crucial for Exine Pattern Formation and Cell Integrity of Microspores in *Arabidopsis*.” *Plant Physiology* 147 (2): 852–63. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118026>.

Hajri, Ahmed, Chrystelle Brin, Shuai Zhao, Perrine David, Jia-Xun Feng, Ralf Koebnik, Boris Szurek, Valérie Verdier, Tristan Boureau, and Stephane Poussier. 2012. “Multilocus Sequence Analysis and Type III Effector Repertoire Mining Provide New Insights into the Evolutionary History and Virulence of *Xanthomonas Oryzae*.” *Molecular Plant Pathology* 13 (3): 288–302. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00745.x>.

He, Qi, Dongbo Li, Yongsheng Zhu, Mingpu Tan, Duanpin Zhang, and Xinghua Lin. 2006. "Fine Mapping of Xa2, a Bacterial Blight Resistance Gene in Rice." *Molecular Breeding* 17 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-8698-2>.

Hiei, Yukoh, Yuji Ishida, and Toshihiko Komari. 2015. "Rice, Indica (*Oryza Sativa* L.)." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1223: 155–67. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5_12).

Hirochika, H, E Guiderdoni, G An, Y-I Hsing, M Y Eun, C-D Han, N Upadhyaya, et al. 2004. "Rice Mutant Resources for Gene Discovery." *Plant Molecular Biology* 54 (3): 325–34. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000036368.74758.66>.

Hoorn, Renier A. L. van der, and S Kamoun. 2008. "From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors." *The Plant Cell* 20 (8): 2009–17. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>.

Hopkins, C. M., F. F. White, S. H. Choi, A. Guo, and J. E. Leach. 1992. "Identification of a Family of Avirulence Genes from *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*." *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 5 (6): 451–59.

Hummel, A W., E L. Doyle, and A J. Bogdanove. 2012. "Addition of Transcription Activator-like Effector Binding Sites to a Pathogen Strain-Specific Rice Bacterial Blight Resistance Gene Makes It Effective against Additional Strains and against Bacterial Leaf Streak." *New Phytologist* 195 (4): 883–93. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04216.x>.

Hutin, Mathilde, Alvaro L. Pérez-Quintero, Camilo Lopez, and Boris Szurek. 2015. "MorTAL Kombat: The Story of Defense against TAL Effectors through Loss-of-Susceptibility." *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00535>.

Hutin, Mathilde, François Sabot, Alain Ghesquière, Ralf Koebnik, and Boris Szurek. 2015. "A Knowledge-Based Molecular Screen Uncovers a Broad-Spectrum OsSWEET14 Resistance Allele to Bacterial Blight from Wild Rice." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 84 (4): 694–703. <https://doi.org/10.1111/tpj.13042>.

Iyer, A S., and S R. McCouch. 2004. "The Rice Bacterial Blight Resistance Gene Xa5 Encodes a Novel Form of Disease Resistance." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (12): 1348–54. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.12.1348>.

Jeung, J. U., S. G. Heu, M. S. Shin, C. M. Vera Cruz, and K. K. Jena. 2006. "Dynamics of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Populations in Korea and Their Relationship to Known Bacterial Blight Resistance Genes." *Phytopathology* 96 (8): 867–75. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0867>.

Ji, Zhi-Yuan, Muhammad Zakria, Li-Fang Zou, Li Xiong, Zheng Li, Guang-Hai Ji, and Gong-You Chen. 2014. "Genetic Diversity of Transcriptional Activator-Like Effector Genes in Chinese

Isolates of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola*.” *Phytopathology* 104 (7): 672–82. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-13-0232-R>.

Jiang, Guang-Huai, Zhi-Hui Xia, Yong-Li Zhou, Jia Wan, Da-Yong Li, Run-Sheng Chen, Wen-Xue Zhai, and Li-Huang Zhu. 2006. “Testifying the Rice Bacterial Blight Resistance Gene Xa5 by Genetic Complementation and Further Analyzing Xa5 (Xa5) in Comparison with Its Homolog TFIIAγ1.” *Molecular Genetics and Genomics* 275 (4): 354–66. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-0091-7>.

Johnson, David.E., Jones M.p, Dingkuhn M, and Mahamane M.c. 1998. “Plants de Riz Competitifs Contre Les Adventices Issus Des Ressources Genetiques (*Oryza Sativa* et *Oryza Glaberrima*) Pour l’ Amelioration de La Gestion Des Adventices Dans Les Systemes de Riziculture Pluviale En Afrique de l’ Ouest.” In *Annales ANPP (France)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR20000002946>.

Jones, J. D. G., and J L. Dangl. 2006. “The Plant Immune System.” *Nature* 444 (7117): 323–29. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.

Jones, R. K., L. W. Barnes, C. F. Gonzalez, J. E. Leach, A. M. Alvarez, and A. A. Benedict. 1989. “Identification of Low-Virulence Strains of *Xanthomonas Campestris* Pv. *Oryzae* from Rice in the United States.” *Phytopathology* 79 (9): 984–90.

Kawahara, Y, M de la Bastide, J P. Hamilton, H Kanamori, W. R McCombie, S Ouyang, D C. Schwartz, et al. 2013. “Improvement of the *Oryza Sativa* Nipponbare Reference Genome Using next Generation Sequence and Optical Map Data.” *Rice (New York, N.Y.)* 6 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-4>.

Kay, Sabine, and Ulla Bonas. 2009. “How *Xanthomonas* Type III Effectors Manipulate the Host Plant.” *Current Opinion in Microbiology*, Host–Microbe Interactions: Bacteria, 12 (1): 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.006>.

Khan, Mueen, Muhammad Naeem, and Muhammad Iqbal. 2014. “Breeding Approaches for Bacterial Leaf Blight Resistance in Rice (*Oryza Sativa* L.), Current Status and Future Directions.” *European Journal of Plant Pathology* 139 (May). <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0377-x>.

Kim, S-M, J-P Suh, Y Qin, T-H Noh, R F. Reinke, and K K. Jena. 2015. “Identification and Fine-Mapping of a New Resistance Gene, Xa40, Conferring Resistance to Bacterial Blight Races in Rice (*Oryza Sativa* L.)” *Theoretical and Applied Genetics* 128 (10): 1933–43. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2557-2>.

Kim, Suk-Man. 2018. “Identification of Novel Recessive Gene Xa44(t) Conferring Resistance to Bacterial Blight Races in Rice by QTL Linkage Analysis Using an SNP Chip.” *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 131 (12): 2733–43. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3187-2>.

Kim, Suk-Man, and Russell F. Reinke. 2019. "A Novel Resistance Gene for Bacterial Blight in Rice, Xa43(t) Identified by GWAS, Confirmed by QTL Mapping Using a Bi-Parental Population." *PloS One* 14 (2): e0211775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211775>.

Kim, Suk-Man, Jung-Pil Suh, Yang Qin, Tae-Hwan Noh, Russell F. Reinke, and Kshirod K. Jena. 2015. "Identification and Fine-Mapping of a New Resistance Gene, Xa40, Conferring Resistance to Bacterial Blight Races in Rice (*Oryza Sativa* L.)." *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 128 (10): 1933–43. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2557-2>.

Klement, Z, and R N Goodman. 1967. "The Hypersensitive Reaction to Infection by Bacterial Plant Pathogens." *Annual Review of Phytopathology* 5 (1): 17–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.05.090167.000313>.

Koebnik, Ralf, Antje Krüger, Frank Thieme, Alexander Urban, and Ulla Bonas. 2006. "Specific Binding of the *Xanthomonas Campestris* Pv. *Vesicatoria* AraC-Type Transcriptional Activator HrpX to Plant-Inducible Promoter Boxes." *Journal of Bacteriology* 188 (21): 7652–60. <https://doi.org/10.1128/JB.00795-06>.

Kojima, Shoko, Yuji Takahashi, Yasushi Kobayashi, Lisa Monna, Takuji Sasaki, Takashi Araki, and Masahiro Yano. 2002. "Hd3a, a Rice Ortholog of the Arabidopsis FT Gene, Promotes Transition to Flowering Downstream of Hd1 under Short-Day Conditions." *Plant and Cell Physiology* 43 (10): 1096–1105. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf156>.

Korinsak, S., S. Sriprakhon, P. Sirithanya, J. Jairin, S. Korinsak, A. Vanavichit, and T. Toojinda. 2009. "Identification of Microsatellite Markers (SSR) Linked to a New Bacterial Blight Resistance Gene Xa33 (t) in Rice Cultivar 'Ba7'." *Maejo International Journal of Science and Technology* 3 (2): 235–47.

Korte, Arthur, and Ashley Farlow. 2013. "The Advantages and Limitations of Trait Analysis with GWAS: A Review." *Plant Methods* 9 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-29>.

Lahaye, Thomas, and Ulla Bonas. 2001. "Molecular Secrets of Bacterial Type III Effector Proteins." *Trends in Plant Science* 6 (10): 479–85. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02083-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02083-0).

Lang, J M., J P. Hamilton, M G Q. Diaz, M A Van Sluys, M. R G. Burgos, C M. Vera Cruz, C. R Buell, N A. Tisserat, and J E. Leach. 2010. "Genomics-Based Diagnostic Marker Development for *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* and *X. Oryzae* Pv. *Oryzicola*." *Plant Disease* 94 (3): 311–19. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0311>.

Lange, Orlando de, Andreas Binder, and Thomas Lahaye. 2014. "From Dead Leaf, to New Life: TAL Effectors as Tools for Synthetic Biology." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 78 (5): 753–71. <https://doi.org/10.1111/tpj.12431>.

- Lee, Byoung-Moo, Young-Jin Park, Dong-Suk Park, Hee-Wan Kang, Jeong-Gu Kim, Eun-Sung Song, In-Cheol Park, et al. 2005. "The Genome Sequence of *Xanthomonas Oryzae* Pathovar *Oryzae* KACC10331, the Bacterial Blight Pathogen of Rice." *Nucleic Acids Research* 33 (2): 577–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gki206>.
- Lee, K. S., S. Rasabandith, E. R. Angeles, and G. S. Khush. 2003. "Inheritance of Resistance to Bacterial Blight in 21 Cultivars of Rice." *Phytopathology* 93 (2): 147–52. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2003.93.2.147>.
- Leyns, F, M De Cleene, J-G Swings, and J De Ley. 1984. "The Host Range of the Genus *Xanthomonas*." *The B R* 50 (3): 308–56. <https://doi.org/10.1007/BF02862635>.
- Li, J-Y, J Wang, and R S. Zeigler. 2014. "The 3,000 Rice Genomes Project: New Opportunities and Challenges for Future Rice Research." *GigaScience* 3 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-3-8>.
- Li, T, S Huang, J Zhou, and B Yang. 2013. "Designer TAL Effectors Induce Disease Susceptibility and Resistance to *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* in Rice." *Molecular Plant* 6 (3): 781–89. <https://doi.org/10.1093/mp/sst034>.
- Li, Ting, Bo Liu, Martin H. Spalding, Donald P. Weeks, and Bing Yang. 2012. "High-Efficiency TALEN-Based Gene Editing Produces Disease-Resistant Rice." *Nature Biotechnology* 30 (5): 390–92. <https://doi.org/10.1038/nbt.2199>.
- Li, Zhikang, Gengyun Zhang, Kenneth L. McNally, Nickolai N. Alexandrov, Ramil P. Mauleon, Hei Leung, and Jauhar Ali. 2014. "The 3,000 Rice Genomes Project." *GigaScience* 3 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-3-7>.
- LiLi, Miao, Wang ChunLian, Zheng ChongKe, Che JinYing, Gao Ying, Wen YiChang, Li GuiQuan, and Zhao KaiJun. 2010. "Molecular mapping of a new gene for resistance to rice bacterial blight." *Scientia Agricultura Sinica* 43 (15): 3051–58.
- Lin, L, GH Ji, GZ Ma, YJ Wang, and LH Zhang. 2011. "Genotypic Diversity Analysis of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola* in Southwest China by Rep-PCR. in *Acta Agric. Univ. Jiangxiensis* 33:264–269.," 33: 264–269.
- Liu, H., W. Yang, B. Hu, and F. Liu. 2007. "Virulence Analysis and Race Classification of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* in China." *Journal of Phytopathology* 155 (3): 129–35. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01197.x>.
- Liu, J, X Wang, T Mitchell, Y Hu, X Liu, L Dai, and G-L Wang. 2010. "Recent Progress and Understanding of the Molecular Mechanisms of the Rice–Magnaporthe *Oryzae* Interaction." *Molecular Plant Pathology* 11 (3): 419–27. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00607.x>.

- Liu, Q, M Yuan, Y Zhou, X Li, J Xiao, and S Wang. 2011. "A Paralog of the MtN3/Saliva Family Reccessively Confers Race-Specific Resistance to *Xanthomonas Oryzae* in Rice." *Plant, Cell & Environment* 34 (11): 1958–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02391.x>.
- Liu, Wende, Jinling Liu, Lindsay Triplett, Jan E. Leach, and Guo-Liang Wang. 2014. "Novel Insights into Rice Innate Immunity Against Bacterial and Fungal Pathogens." *Annual Review of Phytopathology* 52 (1): 213–41. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045926>.
- Lore, J S., Y Vikal, M S. Hunjan, R K. Goel, T S. Bharaj, and G L. Raina. 2011. "Genotypic and Pathotypic Diversity of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*, the Cause of Bacterial Blight of Rice in Punjab State of India: Genetic Diversity in Xoo." *Journal of Phytopathology* 159 (7–8): 479–87. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01789.x>.
- Macarisin, D, S Droby, G Bauchan, and M Wisniewski. 2010. "Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide in the Yeast Antagonist–Fruit Interaction: A New Role for Reactive Oxygen Species in Postharvest Biocontrol?" *Postharvest Biology and Technology* 58 (3): 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.07.008>.
- Mak, Amanda Nga-Sze, Philip Bradley, Adam J Bogdanove, and Barry L Stoddard. 2013. "TAL Effectors: Function, Structure, Engineering and Applications." *Current Opinion in Structural Biology, Folding and binding / Protein-nucleic acid interactions*, 23 (1): 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.11.001>.
- Martin, Gregory B., Adam J. Bogdanove, and Guido Sessa. 2003. "Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins." *Annual Review of Plant Biology* 54 (1): 23–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135035>.
- McCallum, C. M., L. Comai, E. A. Greene, and S. Henikoff. 2000. "Targeted Screening for Induced Mutations." *Nature Biotechnology* 18 (4): 455–57. <https://doi.org/10.1038/74542>.
- McHale, Leah, Xiaoping Tan, Patrice Koehl, and Richard W. Michelmore. 2006. "Plant NBS-LRR Proteins: Adaptable Guards." *Genome Biology* 7 (4): 212. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-4-212>.
- Mew, T W. 1987. "Current Status and Future Prospects of Research on Bacterial Blight of Rice." *Annual Review of Phytopathology* 25 (1): 359–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.25.090187.002043>.
- MEW, T W, and J K Misra. 1994. *A Manual of Rice Seed Health Testing*. [https://books.google.com/books/about/A\\_Manual\\_of\\_Rice\\_Seed\\_Health\\_Testing.html?hl=f&id=J6t4dQGvUeIC](https://books.google.com/books/about/A_Manual_of_Rice_Seed_Health_Testing.html?hl=f&id=J6t4dQGvUeIC).
- Mew, T. W., C. M. Vera Cruz, and E. S. Medalla. 1992. "Changes in Race Frequency of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* in Response to Rice Cultivars Planted in the Philippines." *Plant Disease (USA)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9317148>.

- Midha, Samriti, Kanika Bansal, Sanjeet Kumar, Anil Madhusoodana Girija, Deo Mishra, Kranthi Brahma, Gouri Sankar Laha, Raman Meenakshi Sundaram, Ramesh V. Sonti, and Prabhu B. Patil. 2017. "Population Genomic Insights into Variation and Evolution of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*." *Scientific Reports* 7 (January). <https://doi.org/10.1038/srep40694>.
- Mir, G. N., and G. S. Khush. 1990. "Genetics of Resistance to Bacterial Blight in Rice Cultivar DV 86." *Crop Research (Hisar)* 3 (2): 194–98.
- Mishra, D, M R Vishnupriya, M G Anil, K Konda, Y Raj, and R V. Sonti. 2013. "Pathotype and Genetic Diversity amongst Indian Isolates of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*." Edited by I Mokrousov. *PLoS ONE* 8 (11): e81996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081996>.
- Mizukami, T, and S Wakimoto. 1969. "Epidemiology and Control of Bacterial Leaf Blight of Rice." *Annual Review of Phytopathology* 7 (1): 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.07.090169.000411>.
- Monosi, B., R. J. Wisser, L. Pennill, and S. H. Hulbert. 2004. "Full-Genome Analysis of Resistance Gene Homologues in Rice." *Theoretical and Applied Genetics* 109 (7): 1434–47. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1758-x>.
- Morgante, Michele, and Francesco Salamini. 2003. "From Plant Genomics to Breeding Practice." *Current Opinion in Biotechnology* 14 (2): 214–19. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00028-4).
- Moscou, M J., and A J. Bogdanove. 2009. "A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors." *Science* 326 (5959): 1501–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1178817>.
- Moskvina, Valentina, and Karl Michael Schmidt. 2008. "On Multiple-Testing Correction in Genome-Wide Association Studies." *Genetic Epidemiology* 32 (6): 567–73. <https://doi.org/10.1002/gepi.20331>.
- Mysore, Kirankumar S, and Choong-Min Ryu. 2004. "Nonhost Resistance: How Much Do We Know?" *Trends in Plant Science* 9 (2): 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.12.005>.
- Nakai, H., K. Nakamura, S Kuwahara, and M Saito. 1998. "29. Genetic Studies of an Induced Rice Mutant Resistant to Multiple Races of Bacterial Leaf Blight." 1998. [http://archive.gramene.org/newsletters/rice\\_genetics/rgn5/v5V29.html](http://archive.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn5/v5V29.html).
- Nanda, Amrit K., Emilie Andrio, Daniel Marino, Nicolas Pauly, and Christophe Dunand. 2010. "Reactive Oxygen Species during Plant-Microorganism Early Interactions." *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (2): 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00933.x>.
- Nelson, Rebecca J., Marietta R. Baraoidan, Casiana M. Vera Cruz, Immanuel V. Yap, Jan E. Leach, Twng W. Mew, and Hei Leung. 1994. "Relationship between Phylogeny and Pathotype for the Bacterial Blight Pathogen of Rice." *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (9): 3275–83.

Niño-Liu, D O., P C. Ronald, and A J. Bogdanove. 2006. "Xanthomonas Oryzae Pathovars: Model Pathogens of a Model Crop." *Molecular Plant Pathology* 7 (5): 303–24. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00344.x>.

Noda, T, and A Ohuchi. 1989. "A New Pathogenic Race of Xanthomonas Campestris Pv. Oryzae and Inheritance of Resistance of Differential Rice Variety, Te-Tep to It." *Japanese Journal of Phytopathology* 55 (2): 201–7. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.55.201>.

Ntoukakis, Vardis, Isabel ML Saur, Brendon Conlan, and John P Rathjen. 2014. "The Changing of the Guard: The Pto/Prf Receptor Complex of Tomato and Pathogen Recognition." *Current Opinion in Plant Biology*, SI: Biotic interactions, 20 (August): 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.002>.

Ochiai, H., O. Horino, K. Miyajima, and H. Kaku. 2000. "Genetic Diversity of Xanthomonas Oryzae Pv. Oryzae Strains from Sri Lanka." *Phytopathology* 90 (4): 415–21. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.4.415>.

Ochiai, H, I Yasuhiro, M Takeya, A Sasaki, and H Kaku. 2005. "Genome Sequence of Xanthomonas Oryzae Pv. Oryzae Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity." *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 39 (4): 275–87. <https://doi.org/10.6090/jarq.39.275>.

Ogawa, T. 2008. "Monitoring Race Distribution and Identification of Genes for Resistance to Bacterial Leaf Blight." In *Rice Genetics III*, Volume 3:456–59. Rice Genetics Collection, Volume 3. World Scientific Publishing Company. [https://doi.org/10.1142/9789812814289\\_0047](https://doi.org/10.1142/9789812814289_0047).

Ogawa, T, T Morinaka, K Fujii, and T Kimura. 1978. "Inheritance of Resistance of Rice Varieties Kogyoku and Java 14 to Bacterial Group V of Xanthomonas Oryzae." *Japanese Journal of Phytopathology* 44 (2): 137–41. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.44.137>.

Ogawa, T, and T Yamamoto. 1987. "Selection of Recurrent Parents to Develop Near-Isogenic Lines Resistant to Bacterial Leaf Blight of Rice." *JARQ (Japan)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP8904372>.

Ogawa, T., and T. Yamamoto. 2008. "Inheritance of Resistance to Bacterial Blight in Rice." In *Rice Genetics I*, Volume 1:471–79. Rice Genetics Collection, Volume 1. World Scientific Publishing Company. [https://doi.org/10.1142/9789812814265\\_0041](https://doi.org/10.1142/9789812814265_0041).

Ogawa, T., T Yamamoto, G S. Khush, and T W MEW. 1988. "Near-Isogenic Lines as International Differentials for Resistance to Bacterial Blight of Rice." *Rice Genetics Newsletter* 5: 106–7.

Ogawa, T, T Yamamoto, G. S. Khush, and T-W. Mew. 1991. "Breeding of Near-Isogenic Lines of Rice with Single Genes for Resrstance to Bacterial Blight Pathogen (Xanthomonas Campestris Pv. Oryzae)." *Japanese Journal of Breeding* 41 (3): 523–29. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.41.523>.

Ogawa, Tsugufumi. 1993. "Methods and Strategy for Monitoring Race Distribution and Identification of Resistance Genes to Bacterial Leaf Blight (*Xanthomonas Campestris* P.v. *Oryzae*) in Rice [*Oryza Sativa*]." *JARQ (Japan)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP9403801>.

Onaga, G., R. Murori, G. Habarugira, O. Nyongesa, J. Bigirimana, R. Oliva, C. Vera Cruz, G. Onyango, J. Andaku, and J. Ongom. 2017. "First Report of *Xanthomonas Oryzae* P.v. *Oryzicola* Causing Bacterial Leaf Streak of Rice in Kenya." *Plant Disease* 102 (5): 1025–1025. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0846-PDN>.

Orphanides, G., T. Lagrange, and D. Reinberg. 1996. "The General Transcription Factors of RNA Polymerase II." *Genes & Development* 10 (21): 2657–83. <https://doi.org/10.1101/gad.10.21.2657>.

Ou, S H. 1985. *Rice Diseases*. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, United Kingdom. IRRI.

Ouedraogo, S. L., I. Somda, I. Wonni, and Y. Seré. 2008. "Etude de la Résistance au Flétrissement Bactérien de Lignées Inter-Et Intraspécifiques de Riz de Bas-Fonds en Conditions D'infestation Artificielles," August. <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/47428>.

Pandey, Manish K., N. Shobha Rani, R. M. Sundaram, G. S. Laha, M. S. Madhav, K. Srinivasa Rao, Injey Sudharshan, et al. 2013. "Improvement of Two Traditional Basmati Rice Varieties for Bacterial Blight Resistance and Plant Stature through Morphological and Marker-Assisted Selection." *Molecular Breeding* 31 (1): 239–46. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9779-7>.

Park, Chang-Jin, Ying Peng, Xuwei Chen, Christopher Dardick, DeLing Ruan, Rebecca Bart, Patrick E. Canlas, and Pamela C. Ronald. 2008. "Rice XB15, a Protein Phosphatase 2C, Negatively Regulates Cell Death and XA21-Mediated Innate Immunity." *PLOS Biology* 6 (9): e231. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060231>.

Peng, Ying, Laura E. Bartley, Xuwei Chen, Christopher Dardick, Mawsheng Chern, Randy Ruan, Patrick E. Canlas, and Pamela C. Ronald. 2008. "OsWRKY62 Is a Negative Regulator of Basal and Xa21-Mediated Defense against *Xanthomonas Oryzae* P.v. *Oryzae* in Rice." *Molecular Plant* 1 (3): 446–58. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn024>.

Pflieger, Stéphanie, Véronique Lefebvre, and Mathilde Causse. 2001. "The Candidate Gene Approach in Plant Genetics: A Review." *Molecular Breeding* 7 (4): 275–91. <https://doi.org/10.1023/A:1011605013259>.

Pidon, H, A Ghesquière, S Chéron, S Issaka, E Hébrard, F Sabot, O Kolade, D Silué, and L Albar. 2017. "Fine Mapping of RYMV3: A New Resistance Gene to Rice Yellow Mottle Virus from *Oryza Glaberrima*." *Theoretical and Applied Genetics* 130 (4): 807–18. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2853-0>.

Poulin, L., P. Grygiel, M. Magne, L. Gagnevin, L. M. Rodriguez-R, N. Forero Serna, S. Zhao, et al. 2015. "New Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Tool for Surveillance and Local Epidemiology of Bacterial Leaf Blight and Bacterial Leaf Streak of Rice Caused by *Xanthomonas Oryzae*." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (2): 688–98. <https://doi.org/10.1128/AEM.02768-14>.

Poulin, L., H. Raveloson, M. Sester, L.-M. Raboin, D. Silué, R. Koebnik, and B. Szurek. 2014. "Confirmation of Bacterial Leaf Streak Caused by *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola* on Rice in Madagascar." *Plant Disease* 98 (10): 1423–1423. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0132-PDN>.

Quibod, I L, A Perez-Quintero, N J. Booher, G S. Dossa, G Grande, B Szurek, C Vera Cruz, A J. Bogdanove, and R Oliva. 2016. "Effector Diversification Contributes to *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Phenotypic Adaptation in a Semi-Isolated Environment." *Scientific Reports* 6 (September). <https://doi.org/10.1038/srep34137>.

Quirino, B. F., J. Normanly, and R. M. Amasino. 1999. "Diverse Range of Gene Activity during *Arabidopsis Thaliana* Leaf Senescence Includes Pathogen-Independent Induction of Defense-Related Genes." *Plant Molecular Biology* 40 (2): 267–78.

Raymundo, A. K., A. M. Briones, E. Y. Ardales, M. T. Perez, L. C. Fernandez, J. E. Leach, T. W. Mew, M. A. Ynalvez, C. G. McLaren, and R. J. Nelson. 1999. "Analysis of DNA Polymorphism and Virulence in Philippine Strains of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola*." *Plant Disease* 83 (5): 434–40. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.434>.

Reversat, George, and D Destombes. 1998. "Screening for Resistance to *Heterodera Sacchari* in the Two Cultivated Rice Species, *Oryza Sativa* and *O. Glaberrima*," no. 4: 11.

Romer, P., S. Recht, and T. Lahaye. 2009. "A Single Plant Resistance Gene Promoter Engineered to Recognize Multiple TAL Effectors from Disparate Pathogens." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (48): 20526–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908812106>.

Römer, P, S Recht, T Strauss, J Elsaesser, S Schornack, J Boch, S Wang, and T Lahaye. 2010. "Promoter Elements of Rice Susceptibility Genes Are Bound and Activated by Specific TAL Effectors from the Bacterial Blight Pathogen, *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*." *The New Phytologist* 187 (4): 1048–57. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03217.x>.

Ronald, Pamela C., Beng Albano, Rodante Tabien, Lleva Abenes, Kung-sheng Wu, Susan McCouch, and Steven D. Tanksley. 1992. "Genetic and Physical Analysis of the Rice Bacterial Blight Disease Resistance Locus, *Xa21*." *Molecular and General Genetics MGG* 236 (1): 113–20. <https://doi.org/10.1007/BF00279649>.

Ryba-White, M., J. L. Notteghem, and J. E. Leach. 1995. "Comparison of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Strains from Africa, North America, and Asia by Restriction Fragment Length

Polymorphism Analysis.” *International Rice Research Notes (Philippines)*.  
<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QR9500053>.

Sakaguchi, S. 1967. “Linkage Studies on the Resistance to Bacterial Leaf Blight, *Xanthomonas Oryzae* (Uyeda et Ishiyama) DOWSON, in Rice.” *Bull. Natl. Inst. Agr. Sci. Ser.* 16: 1–18.

Salzberg, S L., D D. Sommer, D Puiu, and V T. Lee. 2008. “Gene-Boosted Assembly of a Novel Bacterial Genome from Very Short Reads.” *PLOS Computational Biology* 4 (9): e1000186.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000186>.

Salzberg, S L., D D. Sommer, M C. Schatz, A M. Phillippy, P D. Rabinowicz, S Tsuge, A Furutani, et al. 2008. “Genome Sequence and Rapid Evolution of the Rice Pathogen *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* PXO99A.” *BMC Genomics* 9 (1): 204. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-204>.

Sarra, S, L Diarra, M Dembele, M M Coulibaly, and Y Séré. 2010. “Characterization of Bacterial Leaf Blight Epidemic in the Office Du Niger (Mali) and Search for a Sustainable Resistance against the Pathogen,” July.

Scholze, H, and J Boch. 2011. “TAL Effectors Are Remote Controls for Gene Activation.” *Current Opinion in Microbiology*, Host–microbe interactions, 14 (1): 47–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.12.001>.

Schornack, Sebastian, Annett Meyer, Patrick Römer, Tina Jordan, and Thomas Lahaye. 2006. “Gene-for-Gene-Mediated Recognition of Nuclear-Targeted AvrBs3-like Bacterial Effector Proteins.” *Journal of Plant Physiology* 163 (3): 256–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.001>.

Schornack, Sebastian, Matthew J. Moscou, Eric R. Ward, and Diana M. Horvath. 2013. “Engineering Plant Disease Resistance Based on TAL Effectors.” *Annual Review of Phytopathology* 51 (1): 383–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102255>.

Second, Gerard. 1982. “Origin of the Genic Diversity of Cultivated Rice (*Oryza* Spp.): Study of the Polymorphism Scored at 40 Isozyme Loci.” *The Japanese Journal of Genetics* 57 (1): 25–57.  
<https://doi.org/10.1266/jjg.57.25>.

Seo, Young-Su, Mawsheng Chern, Laura E. Bartley, Muho Han, Ki-Hong Jung, Insuk Lee, Harkamal Walia, et al. 2011. “Towards Establishment of a Rice Stress Response Interactome.” *PLOS Genetics* 7 (4): e1002020. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002020>.

Shen, Yuwei, Parveen Sharma, Francisco G. da Silva, and Pamela Ronald. 2002. “The *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* RaxP and RaxQ Genes Encode an ATP Sulphurylase and Adenosine-5'-Phosphosulphate Kinase That Are Required for AvrXa21 Avirulence Activity.” *Molecular Microbiology* 44 (1): 37–48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02862.x>.

SiBin, Guo, Zhang DuanPin, and Lin XingHua. 2010. "Identification and mapping of a novel bacterial blight resistance gene Xa35(t) originated from *Oryza minuta*." *Scientia Agricultura Sinica* 43 (13): 2611–18.

Sidhu, G. S. 1978. "Dominance Reversal of a Bacterial Blight Resistance Gene in Some Rice Cultivars." *Phytopathology* 68 (3): 461. <https://doi.org/10.1094/Phyto-68-461>.

Sidhu, G. S., G. S. Khush, and T. W. Mew. 1978. "Genetic Analysis of Bacterial Blight Resistance in Seventy-Four Cultivars of Rice, *Oryza Sativa* L." *Theoretical and Applied Genetics* 53 (3): 105–11. <https://doi.org/10.1007/BF00272687>.

Singh, R. J., G. S. Khush, and T. W. Mew. 1983. "A New Gene for Resistance to Bacterial Blight in Rice 1." *Crop Science* 23 (3): 558–60. <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300030026x>.

SiYuan, Bao, Tan MingPu, and Lin XingHua. 2010. "Genetic mapping of a bacterial blight resistance gene Xa14 in rice." *Acta Agronomica Sinica* 36 (3): 422–27.

Song, Congfeng, and Bing Yang. 2010. "Mutagenesis of 18 Type III Effectors Reveals Virulence Function of XopZPXO99 in *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23 (7): 893–902. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0893>.

Song, Wen-Yuan, Guo-Liang Wang, Li-Li Chen, Han-Suk Kim, Li-Ya Pi, Tom Holsten, J. Gardner, et al. 1995. "A Receptor Kinase-Like Protein Encoded by the Rice Disease Resistance Gene, Xa21." *Science* 270 (5243): 1804–6. <https://doi.org/10.1126/science.270.5243.1804>.

Soriano, Imelda R., Veronique Schmit, Darshan S. Brar, Jean-Claude Prot, and Georges Reversat. 1999. "Resistance to Rice Root-Knot Nematode *Meloidogyne Graminicola* Identified in *Oryza Longistaminata* and *O. Glaberrima*." *Nematology* 1 (4): 395–98. <https://doi.org/10.1163/156854199508397>.

Soto-Suárez, M, C González, B Piégu, J Tohme, and V Verdier. 2010. "Genomic Comparison between *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* and *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola*, Using Suppression-Subtractive Hybridization." *FEMS Microbiology Letters* 308 (1): 16–23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01985.x>.

Strauß, Tina, Remco M. P. van Poecke, Annett Strauß, Patrick Römer, Gerald V. Minsavage, Sylvia Singh, Christina Wolf, et al. 2012. "RNA-Seq Pinpoints a *Xanthomonas* TAL-Effector Activated Resistance Gene in a Large-Crop Genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (47): 19480–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212415109>.

Streubel, J, C Pesce, M Hutin, R Koebnik, J Boch, and B Szurek. 2013. "Five Phylogenetically Close Rice SWEET Genes Confer TAL Effector-Mediated Susceptibility to *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*." *New Phytologist*, November, 808–19.

[https://doi.org/10.1111/nph.12411@10.1002/\(ISSN\)1469-8137\(CAT\)VirtualIssues\(VI\)Phytopathogeneffectorproteins](https://doi.org/10.1111/nph.12411@10.1002/(ISSN)1469-8137(CAT)VirtualIssues(VI)Phytopathogeneffectorproteins).

Sugio, Akiko, Bing Yang, Tong Zhu, and Frank F. White. 2007. "Two Type III Effector Genes of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Control the Induction of the Host Genes OsTFIIA $\gamma$ 1 and OsTFX1 during Bacterial Blight of Rice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (25): 10720–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701742104>.

Sun, X., Z. Yang, S. Wang, and Q. Zhang. 2003. "Identification of a 47-Kb DNA Fragment Containing Xa4, a Locus for Bacterial Blight Resistance in Rice." *Theoretical and Applied Genetics* 106 (4): 683–87. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1117-8>.

Sun, Xinli, Yinglong Cao, Zhifen Yang, Caiguo Xu, Xianghua Li, Shiping Wang, and Qifa Zhang. 2004. "Xa26, a Gene Conferring Resistance to *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* in Rice, Encodes an LRR Receptor Kinase-like Protein." *The Plant Journal* 37 (4): 517–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01976.x>.

Sweeney, Megan, and Susan McCouch. 2007. "The Complex History of the Domestication of Rice." *Annals of Botany* 100 (5): 951–57. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm128>.

Swings, J., M. Van Den Mooter, L. Vauterin, B. Hoste, M. Gillis, T. W. Mew, and K. Kersters. 1990. "Reclassification of the Causal Agents of Bacterial Blight (*Xanthomonas Campestris* Pv. *Oryzae*) and Bacterial Leaf Streak (*Xanthomonas Campestris* Pv. *Oryzicola*) of Rice as Pathovars of *Xanthomonas Oryzae* (Ex Ishiyama 1922) Sp. Nov., Nom. Rev." *International Journal of Systematic Bacteriology* 40 (3): 309–11. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-309>.

Szurek, B., E. Marois, U. Bonas, and G. Van den Ackerveken. 2001. "Eukaryotic Features of the *Xanthomonas* Type III Effector AvrBs3: Protein Domains Involved in Transcriptional Activation and the Interaction with Nuclear Import Receptors from Pepper." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 26 (5): 523–34.

Tagawa, Takeaki, Kenji Hirao, and Fumitake Kubota. 2000. "A Specific Feature of Nitrogen Utilization Efficiency in Leaf Photosynthesis in *Oryza Glaberrima* Steud." *Japanese Journal of Crop Science* 69 (1): 74–79. <https://doi.org/10.1626/jcs.69.74>.

Takahashi, Yuji, Ayahiko Shomura, Takuji Sasaki, and Masahiro Yano. 2001. "Hd6, a Rice Quantitative Trait Locus Involved in Photoperiod Sensitivity, Encodes the  $\alpha$  Subunit of Protein Kinase CK2." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (14): 7922–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.111136798>.

Takken, F. L. W., and W. I. L. Tameling. 2009. "To Nibble at Plant Resistance Proteins." *Science (New York, N.Y.)* 324 (5928): 744–46. <https://doi.org/10.1126/science.1171666>.

Talbot, Nicholas J. 2010. "Cell Biology: Raiding the Sweet Shop." *Nature* 468 (7323): 510–11. <https://doi.org/10.1038/468510a>.

Tan, G. X., X. Ren, Q. M. Weng, Z. Y. Shi, L. L. Zhu, and G. C. He. 2004. “[Mapping of a new resistance gene to bacterial blight in rice line introgressed from *Oryza officinalis*].” *Yi chuan xue bao = Acta genetica Sinica* 31 (7): 724–29.

Tang, Xiaoyan, Yanmei Xiao, and Jian-Min Zhou. 2006. “Regulation of the Type III Secretion System in Phytopathogenic Bacteria.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (11): 1159–66. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1159>.

Taura, S, T Ogawa, A Yoshimura, R Ikeda, and T Omura. 1991. “Identification of a Recessive Resistance Gene in Induced Mutant Line XM5 of Rice to Rice Bacterial Blight.” *Japanese Journal of Breeding* 41 (3): 427–32. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.41.427>.

Taura, Satoru, Tsugufumi Ogawa, Atsushi Yoshimura, Ryoichi Ikeda, and Nobuo IWATA. 1992. “Identification of a Recessive Resistance Gene to Rice Bacterial Blight of Mutant Line XM6, *Oryza Sativa* L.” *Japanese Journal of Breeding* 42 (1): 7–13. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.42.7>.

Thomma, Bart P., Bruno P. Cammue, and Karin Thevissen. 2002. “Plant Defensins.” *Planta* 216 (2): 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>.

Tian, Dongsheng, Junxia Wang, Xuan Zeng, Keyu Gu, Chengxiang Qiu, Xiaobei Yang, Zhiyun Zhou, et al. 2014. “The Rice TAL Effector–Dependent Resistance Protein XA10 Triggers Cell Death and Calcium Depletion in the Endoplasmic Reticulum.” *The Plant Cell*, January, tpc.113.119255. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119255>.

Tran, T. T., A. L. Pérez-Quintero, Issa Wonni, S. C. D. Carpenter, Yanhua Yu, Li Wang, J. E. Leach, et al. 2018. “Functional Analysis of African *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* TALomes Reveals a New Susceptibility Gene in Bacterial Leaf Blight of Rice.” *PLOS Pathogens* 14 (6): e1007092. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007092>.

Triplett, L. R., J. P. Hamilton, C. R. Buell, N. A. Tisserat, V. Verdier, F. Zink, and J. E. Leach. 2011. “Genomic Analysis of *Xanthomonas Oryzae* Isolates from Rice Grown in the United States Reveals Substantial Divergence from Known *X. Oryzae* Pathovars.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (12): 3930–37. <https://doi.org/10.1128/AEM.00028-11>.

Triplett, Lindsay, Ralf Koebnik, Valerie Verdier, and Jan E. Leach. 2014. “The Genomics of *Xanthomonas Oryzae*.” In *Genomics of Plant-Associated Bacteria*, edited by Dennis C. Gross, Ann Lichens-Park, and Chittaranjan Kole, 127–50. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3_6).

Tsuge, S, A Furutani, R Fukunaka, T Oku, K TSUNO, H OCHIAI, Y INOUE, H KAKU, and Y KUBO. 2002. “Expression of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Hrp Genes in XOM2, a Novel Synthetic Medium.” *Journal of General Plant Pathology* 68 (4): 363–71. <https://doi.org/10.1007/PL00013104>.

- Tsuge, Seiji, Takeshi Nakayama, Shinsaku Terashima, Hirokazu Ochiai, Ayako Furutani, Takashi Oku, Kazunori Tsuno, Yasuyuki Kubo, and Hisatoshi Kaku. 2006. "Gene Involved in Transcriptional Activation of the Hrp Regulatory Gene HrpG in *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*." *Journal of Bacteriology* 188 (11): 4158–62. <https://doi.org/10.1128/JB.00006-06>.
- Vaughan, Dunca A., and Hiroco Morishima. 2003. *Biosystematics of the Genus Oryza*, In C.W. Smith (Ed.), *Rice: Origin, History, Technology, and Production*. John Wiley & Sons.
- Vaughan, Duncan A., Koh-ichi Kadowaki, Akito Kaga, and Norihiko Tomooka. 2005. "On the Phylogeny and Biogeography of the Genus *Oryza*." *Breeding Science* 55 (2): 113–22. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.55.113>.
- Vera Cruz, C M., J Bai, I Oña, H Leung, R J. Nelson, T-W Mew, and J E. Leach. 2000. "Predicting Durability of a Disease Resistance Gene Based on an Assessment of the Fitness Loss and Epidemiological Consequences of Avirulence Gene Mutation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (25): 13500–505. <https://doi.org/10.1073/pnas.250271997>.
- Vera Cruz, C. M., F. Gosselé, K. Kersters, P. Segers, M. Van Den Mooter, J. Swings, and J. De Ley. 1984. "Differentiation between *Xanthomonas Campestris* Pv. *Oryzae*, *Xanthomonas Campestris* Pv. *Oryzicola* and the Bacterial 'Brown Blotch' Pathogen on Rice by Numerical Analysis of Phenotypic Features and Protein Gel Electrophoregrams." *Microbiology* 130 (11): 2983–99. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-11-2983>.
- Verdier, V, C Vera Cruz, and J E. Leach. 2012. "Controlling Rice Bacterial Blight in Africa: Needs and Prospects." *Journal of Biotechnology*, *Biotechnology for enhancing plant production and food quality - IBS 2010 Part III*, 159 (4): 320–28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.020>.
- Verdier, Valérie, Lindsay R. Triplett, Aaron W. Hummel, Rene Corral, R. Andres Cernadas, Clarice L. Schmidt, Adam J. Bogdanove, and Jan E. Leach. 2012. "Transcription Activator-like (TAL) Effectors Targeting OsSWEET Genes Enhance Virulence on Diverse Rice (*Oryza Sativa*) Varieties When Expressed Individually in a TAL Effector-Deficient Strain of *Xanthomonas Oryzae*." *The New Phytologist* 196 (4): 1197–1207. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04367.x>.
- Vikal, Y, and D Bhatia. 2017. "Genetics and Genomics of Bacterial Blight Resistance in Rice." *Advances in International Rice Research*. <https://doi.org/10.5772/67361>.
- Vikal, Y, H Chawla, R Sharma, J Lore, and Kuldeep Singh. 2014. "Mapping of Bacterial Blight Resistance Gene Xa8 in Rice (*Oryza Sativa* L.)." *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)* 74 (November): 589. <https://doi.org/10.5958/0975-6906.2014.00895.5>.
- Vitte, C., T. Ishii, F. Lamy, D. Brar, and O. Panaud. 2004. "Genomic Paleontology Provides Evidence for Two Distinct Origins of Asian Rice (*Oryza Sativa* L.)." *Molecular Genetics and Genomics* 272 (5): 504–11. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1069-6>.

Wang, C, G Wen, X Lin, X Liu, and D Zhang. 2009. "Identification and Fine Mapping of the New Bacterial Blight Resistance Gene, Xa31(t), in Rice." *European Journal of Plant Pathology* 123 (2): 235–40. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9356-4>.

Wang, Chunlian, Yinglun Fan, Chongke Zheng, Tengfei Qin, Xiaoping Zhang, and Kaijun Zhao. 2014. "High-Resolution Genetic Mapping of Rice Bacterial Blight Resistance Gene Emphasis Type="Italic">Xa23</Emphasis>High-Resolution Genetic Mapping of Rice Bacterial Blight Resistance Gene Xa23." *Molecular Genetics and Genomics* 289 (5): 745–53. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0848-y>.

Wang, Chunlian, Xiaoping Zhang, Yinglun Fan, Ying Gao, Qinlong Zhu, Chongke Zheng, Tengfei Qin, et al. 2015. "XA23 Is an Executor R Protein and Confers Broad-Spectrum Disease Resistance in Rice." *Molecular Plant* 8 (2): 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.010>.

Wang, Chunlin, Chee-Kok Chin, and Thomas Gianfagna. 2000. "Relationship between Cutin Monomers and Tomato Resistance to Powdery Mildew Infection." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57 (2): 55–61. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0279>.

Wang, Chuntai, Mingpu Tan, Xin Xu, Guosong Wen, Duanpin Zhang, and Xinghua Lin. 2003. "Localizing the Bacterial Blight Resistance Gene, Xa22(t), to a 100-Kilobase Bacterial Artificial Chromosome." *Phytopathology* 93 (10): 1258–62. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.10.1258>.

Wang, C-L, T-F Qin, H-M Yu, X-P Zhang, J-Y Che, Y Gao, C-K Zheng, B Yang, and K-J Zhao. 2014. "The Broad Bacterial Blight Resistance of Rice Line CBB23 Is Triggered by a Novel Transcription Activator-like (TAL) Effector of Xanthomonas Oryzae Pv. Oryzae." *Molecular Plant Pathology* 15 (4): 333–41. <https://doi.org/10.1111/mp.12092>.

Wang, Gongnan, Xinhua Ding, Meng Yuan, Deyun Qiu, Xianghua Li, Caiguo Xu, and Shiping Wang. 2006. "Dual Function of Rice OsDR8 Gene in Disease Resistance and Thiamine Accumulation." *Plant Molecular Biology* 60 (3): 437–49. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-4770-x>.

Wang, W., W. Zhai, M. Luo, G. Jiang, X. Chen, X. Li, R. A. Wing, and L. Zhu. 2001. "Chromosome Landing at the Bacterial Blight Resistance Gene Xa4 Locus Using a Deep Coverage Rice BAC Library." *Molecular Genetics and Genomics* 265 (1): 118–25. <https://doi.org/10.1007/s004380000382>.

Waterhouse, Peter M., and Christopher A. Helliwell. 2003. "Exploring Plant Genomes by RNA-Induced Gene Silencing." *Nature Reviews Genetics* 4 (1): 29–38. <https://doi.org/10.1038/nrg982>.

Weber, Ernst, Tuula Ojanen-Reuhs, Elisabeth Huguet, Gerd Hause, Martin Romantschuk, Timo K. Korhonen, Ulla Bonas, and Ralf Koebnik. 2005. "The Type III-Dependent Hrp Pilus Is

Required for Productive Interaction of *Xanthomonas Campestris* Pv. *Vesicatoria* with Pepper Host Plants.” *Journal of Bacteriology* 187 (7): 2458–68. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2458-2468.2005>.

Wen-Ai, He, Da-hui Huang, Rong-bai Li, Yong-fu Qiu, Jian-dong Song, Hai-ning Yang, Jia-xing Zheng, et al. 2012. “Identification of a Resistance Gene *Bls1* to Bacterial Leaf Streak in Wild Rice *Oryza Rufipogon* Griff.” *Journal of Integrative Agriculture* 11 (6): 962–69. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60087-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60087-2).

Wengelnik, K., and U. Bonas. 1996. “*HrpXv*, an AraC-Type Regulator, Activates Expression of Five of the Six Loci in the *Hrp* Cluster of *Xanthomonas Campestris* Pv. *Vesicatoria*.” *Journal of Bacteriology* 178 (12): 3462–69. <https://doi.org/10.1128/jb.178.12.3462-3469.1996>.

White, Frank F., Neha Potnis, Jeffrey B. Jones, and Ralf Koebnik. 2009. “The Type III Effectors of *Xanthomonas*.” *Molecular Plant Pathology* 10 (6): 749–66. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00590.x>.

White, Frank F, Bing Yang, and Lowell B Johnson. 2000. “Prospects for Understanding Avirulence Gene Function.” *Current Opinion in Plant Biology* 3 (4): 291–98. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00082-0).

Wilkins, Katherine E., Nicholas J. Booher, Li Wang, and Adam J. Bogdanove. 2015. “TAL Effectors and Activation of Predicted Host Targets Distinguish Asian from African Strains of the Rice Pathogen *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola* While Strict Conservation Suggests Universal Importance of Five TAL Effectors.” *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00536>.

Wonni, I., B. Cottyn, L. Detemmerman, S. Dao, L. Ouedraogo, S. Sarra, C. Tekete, et al. 2014. “Analysis of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola* Population in Mali and Burkina Faso Reveals a High Level of Genetic and Pathogenic Diversity.” *Phytopathology* 104 (5): 520–31. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0213-R>.

Wonni, I., L. Ouedraogo, and V. Verdier. 2010. “First Report of Bacterial Leaf Streak Caused by *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola* on Rice in Burkina Faso.” *Plant Disease* 95 (1): 72–72. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-10-0566>.

Wu, L, M L Goh, C Sreekala, and Z Yin. 2008. “XA27 Depends on an Amino-Terminal Signal-Anchored-Like Sequence to Localize to the Apoplast for Resistance to *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*.” *Plant Physiology* 148 (3): 1497–1509. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123356>.

Wu, X, X Li, C Xu, and S Wang. 2008. “Fine Genetic Mapping of *Xa24*, a Recessive Gene for Resistance against *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* in Rice.” *Theoretical and Applied Genetics* 118 (1): 185–91. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0888-y>.

Xia, Chun, Hongqi Chen, and Xudong Zhu. 2012. "Identification, Mapping, Isolation of the Genes Resisting to Bacterial Blight and Application in Rice." *Molecular Plant Breeding* 3 (1). <http://biopublisher.ca/index.php/mpb/article/view/474>.

Xia Zhihui, Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences Zhao Xianfeng, and Chongqing University Jin Liang. 2009. "Resistance evaluation of mayor hybrid rice parents and bacterial blight resistance genes." *Molecular Plant Breeding*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CN2010001776>.

Xiang, Yi, Yinglong Cao, Caiguo Xu, Xianghua Li, and Shiping Wang. 2006. "Xa3, Conferring Resistance for Rice Bacterial Blight and Encoding a Receptor Kinase-like Protein, Is the Same as Xa26." *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 113 (7): 1347–55. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0388-x>.

Xuwei, Jin, Wang Chunlian, and Yang Qing. 2007. "Breeding of near-isogenic line CBB30 and molecular mapping of Xa30(t), a new resistance gene to bacterial blight in rice." *Scientia Agricultura Sinica*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CN2007000740>.

Yang, Bing, Akiko Sugio, and Frank F. White. 2006. "Os8N3 Is a Host Disease-Susceptibility Gene for Bacterial Blight of Rice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (27): 10503–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604088103>.

Yang, Bing, and Frank F. White. 2004. "Diverse Members of the AvrBs3/PthA Family of Type III Effectors Are Major Virulence Determinants in Bacterial Blight Disease of Rice." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (11): 1192–1200. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.11.1192>.

Yang, Bing, Weiguang Zhu, Lowell B. Johnson, and Frank F. White. 2000. "The Virulence Factor AvrXa7 of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Is a Type III Secretion Pathway-Dependent Nuclear-Localized Double-Stranded DNA-Binding Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (17): 9807–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.170286897>.

Yang, Shu-Qing, Shu-Yan Liu, Shuai Zhao, Yan-Hua Yu, Rong-Bai Li, Cheng-Jie Duan, Ji-Liang Tang, and Jia-Xun Feng. 2013. "Molecular and Pathogenic Characterization of New *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Strains from the Coastline Region of Fangchenggang City in China." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (4): 713–20. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1227-7>.

Yang, Z., X. Sun, S. Wang, and Q. Zhang. 2003. "Genetic and Physical Mapping of a New Gene for Bacterial Blight Resistance in Rice." *Theoretical and Applied Genetics* 106 (8): 1467–72. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1205-4>.

Yano, M, Y Katayose, M Ashikari, U Yamanouchi, L Monna, T Fuse, T Baba, et al. 2000. "Hd1, a Major Photoperiod Sensitivity Quantitative Trait Locus in Rice, Is Closely Related to the

Arabidopsis Flowering Time Gene CONSTANS." *The Plant Cell* 12 (12): 2473–83. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.12.2473>.

Yoshimura, A. 1983. "Inheritance of Resistance to Bacterial Blight in Rice Cultivar Cas 209." *Phytopathology* 73: 1409–12. <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-1409>.

Yoshimura, S., Y. Umehara, N. Kurata, Y. Nagamura, T. Sasaki, Y. Minobe, and N. Iwata. 1996. "Identification of a YAC Clone Carrying the Xa-1 Allele, a Bacterial Blight Resistance Gene in Rice." *Theoretical and Applied Genetics* 93 (1): 117–22. <https://doi.org/10.1007/BF00225736>.

Yoshimura, S, A Yoshimura, N Iwata, S R. McCouch, M. L Abenes, M R. Baraoidan, T W Mew, and R J. Nelson. 1995. "Tagging and Combining Bacterial Blight Resistance Genes in Rice Using RAPD and RFLP Markers." *Molecular Breeding* 1 (4): 375–87. <https://doi.org/10.1007/BF01248415>.

Yoshimura, Satomi. 1993. "Genetic Analysis of Bacterial Blight Resistance Genes in Rice by Using Molecular Markers." *Bulletin of the Institute of Tropical Agriculture, Kyushu University* 16: 1–63.

Yoshimura, Satomi, Utako Yamanouchi, Yuichi Katayose, Seiichi Toki, Zi-Xuan Wang, Izumi Kono, Nori Kurata, Masahiro Yano, Nobuo Iwata, and Takuji Sasaki. 1998a. "Expression of Xa1, a Bacterial Blight-Resistance Gene in Rice, Is Induced by Bacterial Inoculation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (4): 1663–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1663>.

———. 1998b. "Expression of Xa1, a Bacterial Blight-Resistance Gene in Rice, Is Induced by Bacterial Inoculation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (4): 1663–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1663>.

Yu, J, G Pressoir, W H. Briggs, I V Bi, M Yamasaki, J F. Doebley, M D. McMullen, et al. 2006. "A Unified Mixed-Model Method for Association Mapping That Accounts for Multiple Levels of Relatedness." *Nature Genetics* 38 (2): 203–8. <https://doi.org/10.1038/ng1702>.

Yu, Jun, Songnian Hu, Jun Wang, Gane Ka-Shu Wong, Songgang Li, Bin Liu, Yajun Deng, et al. 2002. "A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza Sativa* L. Ssp. *Indica*)." *Science (New York, N.Y.)* 296 (5565): 79–92. <https://doi.org/10.1126/science.1068037>.

Yu, Y, J Streubel, S Balzergue, A Champion, J Boch, R Koebnik, J Feng, V Verdier, and B Szurek. 2011. "Colonization of Rice Leaf Blades by an African Strain of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Depends on a New TAL Effector That Induces the Rice Nodulin-3 Os11N3 Gene." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24 (9): 1102–13. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-10-0254>.

Yuan, M, Z Chu, X Li, C Xu, and S Wang. 2010. "The Bacterial Pathogen *Xanthomonas Oryzae* Overcomes Rice Defenses by Regulating Host Copper Redistribution." *The Plant Cell*, September, tpc.110.078022. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078022>.

Yuan, T, X Li, J Xiao, and S Wang. 2011. "Characterization of Xanthomonas Oryzae-Responsive Cis-Acting Element in the Promoter of Rice Race-Specific Susceptibility Gene Xa13." *Molecular Plant* 4 (2): 300–309. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq076>.

Yue, J-X, B C. Meyers, J-Q Chen, D Tian, and S Yang. 2012. "Tracing the Origin and Evolutionary History of Plant Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes." *The New Phytologist* 193 (4): 1049–63. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04006.x>.

Zeng, Xuan, Dongsheng Tian, Keyu Gu, Zhiyun Zhou, Xiaobei Yang, Yanchang Luo, Frank F. White, and Zhongchao Yin. 2015. "Genetic Engineering of the Xa10 Promoter for Broad-Spectrum and Durable Resistance to Xanthomonas Oryzae P.v. Oryzae." *Plant Biotechnology Journal* 13 (7): 993–1001. <https://doi.org/10.1111/pbi.12342>.

Zhang, F, Z-C Wu, M-M Wang, F Zhang, M Dingkuhn, J-L Xu, Y-L Zhou, and Z-K Li. 2017. "Genome-Wide Association Analysis Identifies Resistance Loci for Bacterial Blight in a Diverse Collection of Indica Rice Germplasm." *PLOS ONE* 12 (3): e0174598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174598>.

Zhang, F., D.-L. Zhuo, F. Zhang, L.-Y. Huang, W.-S. Wang, J.-L. Xu, C. Vera Cruz, Z.-K. Li, and Y.-L. Zhou. 2015. "Xa39, a Novel Dominant Gene Conferring Broad-Spectrum Resistance to Xanthomonas Oryzae P.v. Oryzae in Rice." *Plant Pathology* 64 (3): 568–75. <https://doi.org/10.1111/ppa.12283>.

Zhang, H, and S Wang. 2013. "Rice versus Xanthomonas Oryzae P.v. Oryzae: A Unique Pathosystem." *Current Opinion in Plant Biology, Genome studies molecular genetics*, 16 (2): 188–95. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.008>.

Zhang, Q, J Li, Y Xue, B Han, and X W Deng. 2008. "Rice 2020: A Call For An International Coordinated Effort In Rice Functional Genomics." *Molecular Plant* 1 (5): 715–19. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn043>.

Zhao, Bingyu, Edna Y. Ardales, Asuncion Raymundo, Jianfa Bai, Harold N. Trick, Jan E. Leach, and Scot H. Hulbert. 2004. "The AvrRxo1 Gene from the Rice Pathogen Xanthomonas Oryzae P.v. Oryzicola Confers a Nonhost Defense Reaction on Maize with Resistance Gene Rxo1." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (7): 771–79. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.7.771>.

Zhao, Bingyu, Xinghua Lin, Jesse Poland, Harold Trick, Jan Leach, and Scot Hulbert. 2005. "A Maize Resistance Gene Functions against Bacterial Streak Disease in Rice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (43): 15383–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503023102>.

Zhao, Jing, Jing Fu, Xianghua Li, Caiguo Xu, and Shiping Wang. 2009. "Dissection of the Factors Affecting Development-Controlled and Race-Specific Disease Resistance Conferred by Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase-Type R Genes in Rice." *TAG. Theoretical and Applied*

*Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 119 (2): 231–39.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-009-1032-3>.

Zhao, Shuai, Lucie Poulin, Luis M. Rodriguez-R, Natalia Forero Serna, Shu-Yan Liu, Issa Wonni, Boris Szurek, et al. 2012. “Development of a Variable Number of Tandem Repeats Typing Scheme for the Bacterial Rice Pathogen *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzicola*.” *Phytopathology* 102 (10): 948–56. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-12-0078-R>.

Zheng, Chong-Ke, Chun-Lian Wang, Yuan-Jie Yu, Yun-Tao Liang, and Kai-Jun Zhao. 2009. “Identification and Molecular Mapping of Xa32(t), a Novel Resistance Gene for Bacterial Blight (*Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*) in Rice.” *Acta Agronomica Sinica* 35 (7): 1173–80. [https://doi.org/10.1016/S1875-2780\(08\)60089-9](https://doi.org/10.1016/S1875-2780(08)60089-9).

Zhou, Junhui, Zhao Peng, Juying Long, Davide Sosso, Bo Liu, Joon-Seob Eom, Sheng Huang, et al. 2015. “Gene Targeting by the TAL Effector PthXo2 Reveals Cryptic Resistance Gene for Bacterial Blight of Rice.” *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 82 (4): 632–43. <https://doi.org/10.1111/tpj.12838>.

Zhou, Yong-Li, Veronica N. E. Uzokwe, Cong-He Zhang, Li-Rui Cheng, Lei Wang, Kai Chen, Xiao-Qing Gao, et al. 2011. “Improvement of Bacterial Blight Resistance of Hybrid Rice in China Using the Xa23 Gene Derived from Wild Rice (*Oryza Rufipogon*).” *Crop Protection* 30 (6): 637–44. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.12.002>.

Zhu, Chengsong, Michael Gore, Edward Buckler, and Jianming Yu. 2008. “Status and Prospects of Association Mapping in Plants.” *The Plant Genome* 1 (July): 5–20. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2008.02.0089>.

Zipfel, Cyril, and Georg Felix. 2005. “Plants and Animals: A Different Taste for Microbes?” *Current Opinion in Plant Biology* 8 (4): 353–60. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.004>.

Zou, Huasong, Wenxiang Zhao, Xifu Zhang, Yangchun Han, Lifang Zou, and Gongyou Chen. 2010. “Identification of an Avirulence Gene, *Avrxa5*, from the Rice Pathogen *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae*.” *Science China. Life Sciences* 53 (12): 1440–49. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-4109-y>.

Zurbriggen, Matias D., Néstor Carrillo, and Mohammad-Reza Hajirezaei. 2010. “ROS Signaling in the Hypersensitive Response.” *Plant Signaling & Behavior* 5 (4): 393–96. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10793>.