

1. Les partenariats bilatéraux et régionaux

1.1 La pérennisation de la biodiversité

Le décryptage des origines et de la diversité génétique du riz cultivé

Gérard Second,¹ Jean Christophe Glaszmann² et Olivier Panaud³

Des recherches débutées en Afrique de l'ouest en 1974 précisèrent que le riz a été domestiqué indépendamment en Afrique et que les deux sous espèces de riz asiatique s'étaient séparées bien plus tôt qu'estimé, c'est à dire à peu près à la même époque que le riz asiatique et africain, il y a des centaines de milliers d'années — un résultat confirmé suite à la prolifération des marqueurs moléculaires et au séquençage global du génome du riz. Les recherches qui ont suivi démontrent l'importance de recombinaison des sous espèces cultivées entre elles et avec les espèces sauvages. Elles suggèrent aussi une voie inversée pour le développement de nouveaux types de plantes de riz cultivé: la domestication directe d'espèces sauvages par la biotechnologie.

La contribution française au décryptage de l'organisation et de l'origine de la diversité génétique du riz cultivé a débuté en Côte d'Ivoire, Afrique de l'ouest, en 1974. Jusqu'alors, le riz en Afrique n'avait pas attiré grande attention malgré l'augmentation de sa consommation et le fait que, lors de travaux antérieurs reconnus, des botanistes et agronomes français ont montré qu'*Oryza glaberrima* a été domestiqué sur ce continent. Le but de ce programme était de documenter les faits biologiques concernant les espèces de riz sauvages et cultivées en Afrique et d'élaborer des stratégies destinées à la conservation, l'évaluation et l'utilisation efficaces de ces ressources génétiques. Aujourd'hui, l'opportunité d'engager de tels travaux en Afrique ne fait plus de doute puisque la domestication indépendante du riz en Afrique permet de comprendre le processus plus complexe et plus vaste de sa domestication en Asie. Par ailleurs, c'était l'époque où l'on commençait à se servir de marqueurs moléculaires sous la forme du polymorphisme de produits de gènes (isozymes) dans les études génétiques de populations. Compte tenu de la petitesse des chromosomes et du caractère diploïde du riz, la cytogénétique n'avait pu révéler grand-chose sur l'histoire de cette plante, alors qu'au Japon, le célèbre Hitoshi Kihara avait réussi à élucider les antécédents du blé.

Une équipe de généticiens fut constituée dans le but de recueillir et d'évaluer le matériel collecté par rapport à un échantillon représentatif d'accessions de riz d'Asie, à la fois en laboratoire (polymorphisme des isozymes) et sur le terrain (phénotypage, barrières reproductives). En 1977, une réunion de planification à Paris rassembla des représentants de l'Institut international de recherche sur le riz (IRRI), de l'Institut international d'agriculture tropicale (IITA), de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), de l'Association pour le développement de la riziculture en Afrique de l'ouest (ADRAO), de la France et du Japon.

Le travail de l'équipe a nettement tiré partie de l'utilisation des marqueurs moléculaires, même si de nos jours elle peut paraître désuète en regard du séquençage global de l'ADN. Pour autant, le succès de cette approche s'explique aussi par l'adoption d'une analyse statistique multidimensionnelle des données. En d'autres termes, si un arbre phylogénétique suffit pour visualiser des groupes bien différenciés d'accessions polymorphes, l'analyse multidimensionnelle permet de distinguer la position de différents groupes le long d'un continuum entre des extrêmes. Des axes supplémentaires qui ne jouent, peut-être, qu'un rôle mineur dans la variation d'ensemble peuvent signaler, par exemple, une introgression en provenance d'espèces de parenté lointaine, information qui n'apparaîtrait pas sur l'arbre phylogénétique. L'analyse multidimensionnelle a donc contribué à décrypter la structure (au sens « interrelation des parties dans un tout organisé ») de la diversité génétique du riz cultivé.

Une nouvelle hypothèse est avancée

L'un des résultats immédiats a été la confirmation et la documentation, de la domestication indépendante d'*O. glaberrima* à partir d'*O. barthii* (syn. *O. breviligulata*) en Afrique. *O. barthii* est néanmoins une espèce complexe, puisqu'elle



existe sous deux formes malaisées à différencier l'une de l'autre: d'une part, l'espèce sauvage ancestrale que l'on trouve aussi en adventice dans les champs cultivés et, d'autre part, une autre forme adventice d'origine différente, issue de l'hybridation entre *O. sativa* et *O. glaberrima*. Les isozymes ont montré que la distance génétique séparant *O. sativa* d'*O. glaberrima* n'est pas beaucoup plus grande que celle trouvée entre les sous-espèces indica et japonica du riz asiatique (surtout entre leurs formes « ancestrales », définies selon la stérilité pollinique F1). Un résultat qui étonna, car l'hypothèse la plus en vogue à l'époque (et jusqu'à la fin du siècle) était qu'*O. glaberrima* et *O. sativa* avaient évoluées en parallèle jusqu'à la fracture du continent Gondwana (il y a une centaine de millions d'années), tandis que les sous-espèces indica et japonica étaient censées s'être développées à partir l'une de l'autre, au cours de la domestication. Sur la base d'une horloge

moléculaire isozymique, les trois formes de riz cultivé ont au contraire commencé à diverger il y a 300 000 à 2 millions d'années (Second 1982), une datation conçue comme une estimation grossière qui n'a cependant pas été contredite par les estimations ultérieures.

La domestication des types indica et japonica fut proposée s'être produite indépendamment à deux sous-espèces d'*O. rufipogon*, des deux côtés de l'Himalaya. Avec l'avènement de la civilisation humaine, les deux sous-espèces domestiquées se retrouvèrent néanmoins dans les mêmes champs et s'introgressèrent réciproquement. L'équipe française a également démontré l'importance de l'introggression entre des cultivars de diverses origines et les deux espèces *O. barthii* et *O. longistaminata*, en Afrique.

Travaux sur les isozymes effectués à l'IRRI

Au vu de ces développements, Jean-Christophe Glaszmann fut affecté à l'IRRI en 1982 pour développer l'approche isozymique dans les études de la collection mondiale de riz cultivé. Son travail déboucha sur la fameuse identification de six « groupes isozymiques » parmi les cultivars de riz asiatique dans le monde, sur lesquels se trouvent superposés une minorité d'« intermédiaires » (Glaszmann 1987). Des deux études isozymiques évoquées sortent des résultats similaires dans leurs grandes lignes, si ce n'est que l'échantillonnage de variétés est beaucoup plus important dans celle de l'IRRI, ce qui permet d'identifier quatre grands groupes de variétés intermédiaires entre les types préalablement décrits, indica et japonica. Aucune des deux études ne peut cependant différencier les sous-groupes, « tempéré » et « tropical » parmi japonica qui avaient été identifiées au Japon, en fonction de caractéristiques morphologiques et physiologiques et de la stérilité pollinique en croisement.

La plupart des cultivars correspondent aux sous-espèces indica et japonica (groupes 1 et 6, respectivement). Cette distinction rejoint aussi celle que les Chinois font traditionnellement entre le riz Hsien et le riz Keng. Pour autant, la version abâtardie — indica et japonica synonymes de riz à grains longs ou ronds, respectivement — ne repose sur aucun argument scientifique, même si elle est usuelle. Les cultivars restants, qui proviennent surtout d'Asie du sud, sont classés en quatre groupes intermédiaires qui s'insèrent entre les deux types principaux, ou sont intermédiaires entre groupes. Les variétés « Aus » se trouvent regroupées (groupe 2), tout comme la plupart des riz parfumés, dont le type basmati (groupe 5) et des variétés « flottantes » (groupes 3 et 4).

Cette classification corroborant les observations des sélectionneurs au sujet de leurs lignées, quelques 25 000 accès ont été ainsi classés à ce jour.

Par ailleurs, sur la base de données morphologiques disponibles, Jean-Christophe Glaszmann et Michel Arrauveau, qui travaillait à l'IRRI sur l'amélioration du riz pluvial, mirent en évidence une variation du riz japonica entre des extrêmes au Japon, Corée et Chine (formes tempérées) et en Indonésie (formes tropicales, « Javanica »), avec un continuum de formes intermédiaires retrouvées le long de l'Himalaya et dans les zones d'altitude en zone tropicale.

La méthodologie RFLP apporte un plus grand nombre de marqueurs moléculaires

Dans les années 80, la mise au point de la méthodologie dite du « polymorphisme de longueur de fragments de restriction » (RFLP) fait grimper en flèche le nombre de marqueurs moléculaires disponibles et permet ainsi de dresser une carte génétique globale d'un génome. Après qu'il ait élaboré un scénario d'ensemble du genre *Oryza* (Second 1985, 1991) qui s'accorde avec les développements les plus récents issus des études phylogénétiques consacrées aux div-

ers génomes *Oryza* et les nouveaux résultats obtenus sur les fossiles, Gérard Second fut détaché à l'université Cornell en 1988, au laboratoire du Dr Steve Tanksley qui était en train de dresser la première carte RFLP du riz, en collaboration avec l'IRRI. Cette carte RFLP du génome *O. sativa* se composait de fragments pour plusieurs chromosomes. L'on peinait également à faire le lien entre tous les segments de la carte élaborée au Japon. Selon l'hypothèse de l'introgression réciproque concernant l'origine du riz asiatique, il est évident que seule une population à ségrégation interspécifique pouvait aisément régler le problème. Une population de rétrocroisements d'un hybride *O. sativa* x *O. longistaminata*, issue d'un travail d'Alain Ghesquière en Côte d'Ivoire, fut proposée à cette fin. Mathilde Causse fut détachée à l'université Cornell en 1989 pour commencer à travailler sur cette population, ce qui aboutit à la première carte génétique RFLP complète d'*O. sativa* (Causse et al. 1994). À l'époque, l'on discuta également d'idées reposant sur les travaux de l'IRD concernant le riz et le café, afin de promouvoir les recherches sur la variation transgressive.



Gérard Second fut affecté à l'IRRI en 1990 où il caractérisa un échantillon représentatif de 150 accessions *O. sativa* à l'aide de 200 sondes RFLP cartographiées. En substance, la diversité génétique apparaît organisée comme les isozymes l'avaient établi, bien que l'on distingue alors clairement les sous-groupes tempéré et tropical de type japonica. Pour autant, les 200 loci répartis sur le génome ne sont pas assez nombreux pour confirmer l'hypothèse de l'introgression réciproque, hormis dans un seul cas. Sur un segment distal du chromosome 7, le polymorphisme est pratiquement inexistant sur toute l'espèce *O. sativa*. Cependant, lors d'une comparaison RFLP de même type, le polymorphisme de ce segment chromosomique entre *O. sativa* et *O. glaberrima* ou *O. longistaminata* semble normal. L'absence de polymorphisme sur ce segment chromosomique est interprétée comme le fruit d'une introgression d'indica à japonica, ou vice-versa, de sorte que seule une sous-espèce est représentée pour ce fragment dans toute l'espèce *O. sativa* (Second, Parco et Caiolo 1995). La confirmation de ce type d'événements devrait permettre de tester l'hypothèse que l'hybridation entre les variétés ancestrales indica et japonica est à l'origine de tous les groupes isozymiques, à l'exception peut-être d'un petit groupe de variétés ancestrales dans une seule des deux sous-espèces. On aurait, de la sorte, une chaîne de repères temporels dans l'étude de l'évolution du génome du riz.

Une répercussion majeure de l'hypothèse concernant l'origine hybride du riz est que l'interaction entre les gènes (épistasie), plus que l'additivité, est la grande force motrice dans l'amélioration du riz par croisement. En termes génétiques, on peut s'attendre à une variation transgressive importante dans les ségrégations d'hybrides autogames de riz. Voici qui surprend étant donné que la plupart des sélectionneurs prêtaient aux riz indica et japonica une faible aptitude à recombiner.

La simple observation visuelle de deux populations de lignées de riz fixées en descendance d'un seul grain (single seed descent ou SSD), développées à partir de croisements indica x japonica et cultivées à l'IRRI en 1988-1989, permit d'établir que l'éventail de diversité dans ces populations est quasiment comparable à celui d'une collection mondiale de variétés de riz. L'on a pu observer parmi les lignées SSD, même si c'était rare, bien des caractéristiques absentes des deux variétés parentales, ce qui a poussé à essayer de démontrer la variation transgressive de caractéristiques importantes pour améliorer les variétés de riz. Ces lignées SSD ainsi que les deux lignées parentales furent testées pour établir leur tolérance au virus du tungro dans des « points chauds » de prévalence de cette maladie aux Philippines. On a constaté, avec surprise, l'existence de lignées tolérantes alors que les lignées parentales étaient toutes deux sensibles au virus. Il reste que ces expériences n'ont eues à notre connaissance ni suite ni publication.

L'ère post-génomique

Nous sommes désormais dans l'ère post-génomique, qui voit des millions de polymorphisme nucléotidique simple (SNP) et d'insertions/délétions identifiés dans les deux séquences ADN globales représentatives des deux sous-espèces de riz. Ces séquences sont annotées de manière de plus en plus fiable, tout particulièrement pour les gènes transcrits. Des assemblages de chromosomes artificiels bactériens (BAC) couvrant le génome complet de douze accessions *Oryza* représentatives des grands génomes et espèces cytogénétiques sont élaborés et mis à disposition en ressource publique (Projet OMap, Université de l'Arizona, États-Unis). On peut ainsi séquencer un segment particulier, ou le génome complet, de n'importe laquelle d'entre elle.

Un premier aboutissement de cet effort, sous l'angle de notre sujet, est sorti d'une étude de paléontologie génomique sur des insertions datables de rétrotransposons que l'on doit à Olivier Panaud, dans un travail en collaboration avec l'IRRI. Il ressort que les deux génomes séquencés ont divergé l'un de l'autre il y a plus de 200 000 ans, probablement autour

d'un million d'années. Un relevé des polymorphismes d'insertion dans un large éventail de variétés traditionnelles de riz a confirmé que ces résultats correspondent à la divergence indica/japonica. Ces données expérimentales apportent une preuve supplémentaire qui étaye la proposition selon laquelle les riz indica et japonica proviennent de deux événements indépendants de domestication en Asie (Vitte et al. 2004).

Les travaux en cours en France dans ce domaine se poursuivent dans le cadre de deux projets. Le premier, « Haploryza », est mené en collaboration avec l'IRRI. Il cherche à caractériser le déséquilibre de liaison dans 900 lignées de riz sauvage et cultivé sur la base de 1500 SNPs, dans une approche de génétique d'association. Puisque maintes souches d' *O. rufipogon* originaires de Chine et des autres pays d'Asie, ainsi que des accessions hors groupe représentatives de la section *Eu-Oryza* sont incluses, ce travail devrait aussi nous renseigner sur les origines d' *O. sativa*. Une deuxième initiative, « Génome en mosaïque du riz » est menée en collaboration avec l'Institut de botanique de Pékin (IBCAS), Chine. Il vise à creuser l'hypothèse selon laquelle l'introgession réciproque japonica x indica a entraîné une structure en mosaïque du génome de riz cultivé asiatique. Ce projet s'appuie largement sur la bioinformatique, la paléontologie génomique et une validation par séquençage.

Enfin, nous proposons un concept nouveau, celui du potentiel que recèle la domestication des espèces sauvages du genre *Oryza*, à l'aide des biotechnologies de transformation génétique dans l'ère post-génomique. Les espèces allotétraploïdes, notamment les espèces endémiques américaines, seraient les premières candidates pour cette approche. Leur vigueur exceptionnelle parmi le genre *Oryza* pourrait provenir de leur évolution très récente présumée à partir de trois génomes qui trouvent leur origine, respectivement, en Afrique, Asie et Australie. Leur domestication pourrait produire un nouveau type de plante pour les rizières mondiales. Le matériel ainsi créé pourrait aussi servir à vérifier diverses hypothèses, dont le « coût » de la domestication au plan de l'évolution, ou encore la co-évolution du riz et des parasites, de manière à renforcer l'efficacité des programmes d'amélioration d' *O. sativa*. Nous estimons que la domestication est un processus évolutif en cours qui continuera à modifier la structure de la diversité génétique du riz.

¹ Gérard Second est chercheur à l'Institut de recherche pour le développement (IRD) à Montpellier, France, membre de l'Unité mixte de recherche (UMR) « Diversité et génome des plantes cultivées ».

² Jean Christophe Glaszmann est chercheur au Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) à Montpellier, France, directeur de l'UMR « Polymorphismes d'intérêt agronomique ».

³ Olivier Panaud est professeur à l'Université de Perpignan, France, membre de l'UMR « Génome et développement des plantes ».

Références bibliographiques sélectionnées

Causse M, Fulton T, Cho Y, Ahn S, Chunwongse J, Wu K, Zhihong Y, Ronald PC, Harrington S, Second G, McCouch S, Tanksley S. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.

Glaszmann J.C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* 74: 21-30.

Second G 1982. Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jpn. J. Genet.* 57: 25-57

Second G. 1985. Relations évolutives chez le genre *Oryza* et processus de domestication des riz. Coll. Etudes et Thèses, ORSTOM. Paris. 189p.

Second G. 1991. Cytoplasmic DNA markers, phylogeny and systematics in the *Oryzaceae*. International Rice Research Institute. In: *Rice Genetics II*. P.O. Box 933, Manila, Philippines. pp 475-486.

Second G, Parco A, Caiolo A, 1995. The hybrid origin hypothesis of cultivated rice (*Oryza sativa*) explains some of the gaps in its RFLP maps and suggests an efficient mapping population for useful genes and QTLs. In: *Plant Genome and Plastome: Their Structure and Evolution*. K. Tsunewaki ed. Kodansha Scientific LTD. Tokyo. pp 129-136.

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.) *Mol. Gen. Genomics* 272: 504-511.

Part 1. Bilateral & Regional Partnerships

1.1 Sustaining biodiversity for current and future generations

Unravelling the origins and genetic diversity of cultivated rice

Gérard Second,¹ Jean Christophe Glaszmann² and Olivier Panaud³

Research begun in West Africa in the 1970s initially documented that rice was independently domesticated in Africa and indicated that the two subspecies of Asian rice had separated much earlier than previously believed, about at the same time as the separation between Asian and African rice, hundred thousands years ago — a finding confirmed following the proliferation of molecular markers and the global sequencing of rice genome. Further research has demonstrated the importance of recombining cultivated sub-species with one another and wild species. They also suggest a reverse way for future rice plant type development: direct domestication of wild species through biotechnology.

The French contribution to unraveling the genetic diversity of cultivated rice, its origins and its organization started in 1974 in Côte d'Ivoire, West Africa. Up to that time, little attention had been paid to rice in Africa, though its consumption was increasing there and a recognized earlier work of French botanists and agronomists had shown that *Oryza glaberrima* was domesticated in Africa. The aim of the program was to document biological facts regarding African wild and cultivated rice species and develop strategies for efficiently conserving, evaluating and using rice genetic resources. That it was opportune to start this work in Africa is now apparent, since the independent domestication of rice in Africa helps us understand the more complex and extensive process of its domestication in Asia. Also, the program began at a time when molecular markers, in the form of transcribed isoforms of gene products (isozymes), started being used to study population genetics. Because of the small size of rice chromosomes and the diploid nature of cultivated rice, cytogenetics (the biology of chromosomes and their relation to the transmission and recombination of genes) had been unable to determine much about the history of rice in the same way that the pioneering work of Hitoshi Kihara in Japan had successfully unraveled the history of wheat.

A team of geneticists was established to collect and evaluate, both in the laboratory (mostly isozyme polymorphism studies) and in the field (phenotyping and reproductive barrier studies), the collected material in relation to a representative set of accessions of Asian rice. A planning meeting held in Paris in 1977 was attended by representatives of the International Rice Research Institute (IRRI), International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), West Africa Rice Development Association (WARDA, now the Africa Rice Center), France and Japan.

The use of molecular markers, though now seemingly limited compared with the sequencing of the whole rice genome, was an important factor in developing the team's work. However, contributing to the success of this work was also the use of multivariate statistical analysis of the population isozyme diversity data. While a phylogenetic tree is sufficient to visualize well-differentiated groups of polymorphic accessions, multivariate approaches are able to distinguish where different groups lie across a continuum; additional axes that may make only a minor contribution to overall variation may indicate, for example, introgression from distantly related species — information that would not appear on a phylogenetic tree. Multivariate analysis has thus been instrumental in unraveling the structure (the interrelation of parts in an organized whole) of the genetic diversity of cultivated rice.

New hypothesis put forward

One of the first key results obtained was to confirm and document the independent domestication of *O. glaberrima* from *O. barthii* (syn. *O. breviligulata*) in Africa. However, *O. barthii* was revealed to be a complex species, as it had two forms difficult to distinguish: the wild ancestral species, which is found as a weed in cultivated fields, and another weedy form that appeared to be a hybrid of *O. sativa* and *O. glaberrima*. Detailed isozyme studies showed that the genetic distance



between *O. sativa* and *O. glaberrima* was not much larger than that between the two subspecies, indica and japonica, of Asian cultivated rice (particularly between the ancestral forms as determined from F1 pollen sterility). This result was surprising, since the hypothesis receiving the most attention at that time, and until the end of the century, was that *O. glaberrima* and *O. sativa* had evolved in parallel since Gondwanaland split up (circa 100 million years ago), while the indica and japonica subspecies were thought to have separated in the course of domestication. Using a molecular clock based on isozymes indicated that the three forms of cultivated rice began to diverge from each other between 300,000 and 2 million years ago (Second 1982). It is noteworthy that this dating, designed to be a crude estimate, has accommodated all subsequent estimates.

The domestication of indica and japonica was assumed to have occurred independently from two subspecies of *O. rufipogon* on either side of the Himalayas. Following the rise of civilization, however, the two crops were brought together in the same fields and introgressed with each other. The French group in Africa also demonstrated the importance of introgression between cultivars of various origins and both *O. barthii* and *O. longistaminata* in Africa.

Isozyme work developed at IRR1

In view of these developments, Jean Christophe Glaszmann was posted at IRR1 in 1982 to develop the isozyme approach and apply it to the world collection of cultivated rice conserved at the institute. His work resulted in the famous six isozyme groups of Asian rice cultivars, on which some intermediates are superimposed (Glaszmann 1987). The two largely independent isozyme studies produced broadly similar results, but a much wider sample of *O. sativa* was used in the study at IRR1, allowing the identification of four main groups of varieties intermediate between indica and japonica. Still, neither study was able to distinguish a temperate and a tropical subgroup among japonica accessions that had previously been identified in Japan on the basis of morphological and physiological characteristics, as well as on the basis of hybrid pollen sterility.

Most cultivars corresponded to the indica and japonica subspecies (groups 1 and 6, respectively). This classification of two main groups of cultivars corresponds with the traditional Chinese distinction of *hsien* and *keng* rice. It is important to note that, although still in common use, the corrupted version of this classification — indica (long grain) and japonica (round grain) — appears to have no scientific support. The rest of the cultivars were mainly from South Asia and classified in four groups intermediate between the two main types, or falling between any two of the six groups. Aus varieties fell together (group 2), as did most of the aromatic rices including basmati-like accessions (group 5), and some deep-water rices (groups 3 and 4). This classification thus corroborates the observations of breeders regarding their progenies. To date, some 25,000 accessions have been classified with isozymes.

An analysis of the morphological data on japonica rices available at IRR1, conducted by Jean Christophe Glaszmann and Michel Arraudeau, a French rice breeder then posted at IRR1 to develop rainfed rice varieties, showed variation between the extremes found in Japan, Korea and China (temperate forms) and in Indonesia (tropical javanica forms), with an array of intergrades along the Himalayas and in tropical highlands.

New technique identifies many more molecular markers

The arrival of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) methodology in the 1980s dramatically increased the number of molecular markers available, thus allowing the construction of global genetic maps of plant genomes. After he developed a comprehensive scenario of the genus *Oryza* that accommodates until now the most recent developments of phylogenetic studies among the various *Oryza* genomes, as well as new fossil evidence (Second 1985, 1991), Gérard Second was posted in 1988 at Cornell University in the laboratory of Steve Tanksley, who was developing the first RFLP map of rice in collaboration with IRR1. In 1988, this RFLP map of the *O. sativa* genome consisted of disconnected pieces of several chromosomes. Difficulties also existed in linking all chromosomal segments of the 12 chromosomes of rice in the map being developed in Japan. The reciprocal introgression hypothesis of the origin of Asian rice made clear that only an interspecific segregating population could easily solve this problem. A backcross population of an *O. sativa* × *O. longistaminata* hybrid, available from Alain Ghesquière's work in Côte d'Ivoire, was proposed as a candidate for this study. Mathilde Causse was posted at Cornell in 1989 to initiate work on this line, which developed into the first complete RFLP

genetic map of *O. sativa* (Causse et al. 1994). Ideas based on French work on rice and coffee in particular were also debated at that time to promote work on transgressive segregations.

Gérard Second, posted at IRRI in 1990, characterized a representative set of 150 *O. sativa* accessions through polymorphism at 200 mapped RFLP probes. Basically, the same organization of genetic diversity appeared as that unraveled by isozymes, with the addition that the temperate and tropical japonica subgroups could now be clearly distinguished. However, the 200 loci distributed on the genome were too few to confirm the reciprocal introgression hypothesis — with one main exception. A distal segment of chromosome 7 showed little polymorphism across the whole *O. sativa* species. In a similar RFLP comparison, however, the polymorphism of this chromosome segment between *O. sativa* and *O. glaberrima* or *O. longistaminata* appeared normal. The lack of polymorphism of this chromosome segment in Asian cultivated rice was interpreted as resulting from an introgression from indica to japonica, or vice versa, so that only one subspecies was represented on this fragment in the whole *O. sativa* species (Second et al. 1995). Confirmation of this type of event should allow testing to determine whether hybridization between ancestral indica and japonica occurred at the origin of all isozyme groups (save for a possible small group of ancestral varieties in only one of the two subspecies), which would provide a temporal benchmark for studying the evolution of the rice genome.



An important consequence of the hypothesis of the hybrid origin of rice is that interaction between genes (epistasis), more than additive effects, is the main driving force in rice domestication and breeding. In breeders' terms, transgressive variation may be expected to be high in selfed rice hybrid derivatives. This was surprising, as most rice breeders believed that indica and japonica rice combined only with difficulty.

A simple visual observation of two populations of rice lines developed from indica × japonica crosses, fixed in single seed descent (SSD) and grown at IRRI in 1988-1989 suggested that the range of diversity in these populations was nearly comparable to that of the world collection of rice varieties. Numerous characteristics absent from the two parental varieties could be observed among the SSD plants, though sometimes rarely. This prompted attempts to demonstrate transgressive variation for characteristics important in rice breeding. SSD lines along the two parental lines were screened for tolerance to tungro virus in a hot spot of disease prevalence in the Philippines. Surprisingly, tolerant plants were observed, though the parental lines were both susceptible. These experiments were neither pursued nor published.

The post-genomic era

We are now in the time of post genomics, with millions of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertions/deletions identified in the two global DNA sequences representing the two rice subspecies. These sequences are increasingly reliably annotated, especially for transcribed genes. Assemblies of bacterial artificial chromosomes are being developed as a public resource, covering the entire genome of 12 accessions of *Oryza* that are representative of the main cytogenetic genomes and species. A particular area, or the whole genome of each, can now be sequenced on any of them (e.g., the OMap project at the University of Arizona, USA).

A first outcome of this effort in relation to our present topic came from a genomic paleontology study of dateable insertions of retrotransposons and their distribution in Asian cultivated rice, conducted by Olivier Panaud in collaboration with IRRI. This indicated that the two genomes being globally sequenced diverged from each other at least 200,000 years ago and probably around 1 million years ago. A survey of insertion polymorphisms in a wide range of traditional rice varieties confirmed that these results correspond to the indica-japonica divergence. These experimental data provide additional evidence for the proposal that indica and japonica rice arose from two independent domestication events in Asia (Vitte et al. 2004).

Two projects are under way along these lines in France:

- i) The Haploryza Project, conducted in collaboration with IRRI, takes an association mapping approach and aims to characterize linkage disequilibrium in 900 wild and cultivated rice lines using 1,500 SNPs. As numerous strains of *O. rufipogon* originated in China as well as in the rest of Asia, and out-group accessions representative of the section *Eu-Oryza* are included, the work is expected to yield information on the origin of *O. sativa*.
- ii) The Mosaic Rice Genome Project, conducted in collaboration with the Institute of Botany in Beijing, China, aims to further investigate the introgression hypothesis in light of the mosaic structure of genome variation in Asian cultivated rice. It is largely based on a bioinformatics approach, genomic paleontology and sequencing validation.

Finally, we put forward a new concept. Breeding of new plant types has been done so far on the base of traditionally domesticated cultivars. However, biotechnology in the post-genomic era allows us to envision directly domesticating wild species and breeding them with only a small contribution from the *O. sativa* genome. Allotetraploid species, in particular the endemic American species, would be the first candidates for this approach. Their outstanding vigor compared with other species of the genus *Oryza* may be related to their presumed very recent evolution from the three genomes B, C and E, which originated in Africa, Asia and Australia, respectively. Their domestication could deliver a new plant type to world rice fields. The material created could also be used to test various hypotheses — such as the evolutionary cost of domestication or the co-evolution of host and parasites — in a way that increases the efficiency of *O. sativa* improvement programs. We believe that domestication is an ongoing evolutionary process that will continue to modify the structure of genetic diversity of cultivated rice.

¹ Gérard Second is a member of the Diversity and Genome of Cultivated Plants research unit. He is affiliated to the Institut de recherche pour le développement (IRD) in Montpellier, France.

² Jean Christophe Glaszmann is a member of the Polymorphisms of Interest in Agriculture research unit. He is affiliated to the Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) in Montpellier, France.

³ Olivier Panaud is a member of the Genome and Plant Development Laboratory research unit. He is professor at the University of Perpignan, France.

Selected references

Causse M, Fulton T, Cho Y, Ahn S, Chunwongse J, Wu K, Zhihong Y, Ronald PC, Harrington S, Second G, Mccouch S, Tanksley S. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138:1251-1274.

Glaszmann JC. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* 74:21-30.

Second G. 1982. Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): Study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jpn. J. Genet.* 57:25-57.

Second G. 1985. Relations évolutives chez le genre *Oryza* et processus de domestication des riz. Coll. Etudes et Thèses, ORSTOM. Paris. 189 p.

Second G. 1991. Cytoplasmic DNA markers, phylogeny and systematics in the *Oryzaeae*. International Rice Research Institute. In: *Rice Genetics II*. Manila, Philippines. pp 475-486.

Second G, Parco A, Caiolo A. 1995. The hybrid origin hypothesis of cultivated rice (*Oryza sativa*) explains some of the gaps in its RFLP maps and suggests an efficient mapping population for useful genes and QTLs. In: *Plant Genome and Plastome: Their Structure and Evolution*. Tsunewaki K, (ed.). Kodansha Scientific Ltd. Tokyo. pp 129-136.

Vitte C, Ishii T, Lamy F, Brar D, Panaud O. 2004. Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genomics* 272:504-511.



LA FRANCE ET LE CGIAR:

DES RÉSULTATS SCIENTIFIQUES POUR LA RECHERCHE AGRICOLE INTERNATIONALE

La présente publication a été coordonnée par Daniel Rocchi et placée sous l'autorité scientifique d'un Comité de rédaction composé paritairement d'experts du CGIAR et français: Denis Despréaux,¹ Emile Frison,² Bernard Hubert³ et Manuel Lantin⁴.

Les articles signés sont de la responsabilité de leurs auteurs et les textes non signés sont de la responsabilité du Comité de rédaction.

Daniel Rocchi est officier de liaison au Secrétariat du CGIAR à Washington depuis 2005, mis à disposition par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Titulaire d'un doctorat en sociologie rurale, il a occupé différentes responsabilités en matière d'aménagement et de développement de l'espace rural, notamment aux Antilles, avant de rejoindre, en 1999, la Direction générale de l'enseignement et de la recherche de ce ministère où il s'est spécialisé dans l'administration de la recherche.

¹ Denis Despréaux est sous directeur de la performance de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation au ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Il est aussi secrétaire exécutif de la Commission de la recherche agricole internationale (CRAI). Titulaire d'un doctorat en phytopathologie, il a consacré sa carrière scientifique aux cultures pérennes tropicales.

² Emile Frison est directeur général de l'Institut international des ressources phytogénétiques (IPGRI) depuis août 2003. Titulaire d'un doctorat en pathologie des plantes, il a consacré une part importante de sa carrière à la recherche agricole internationale pour le développement.

³ Bernard Hubert, titulaire d'un doctorat en écologie, a étudié l'écologie des rongeurs en Afrique de l'ouest avant de rejoindre l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) où il a dirigé le département de recherche «Systèmes agraires et développement ». Aujourd'hui, il est directeur scientifique de la division Société, Économie, Décision et responsable de la problématique de développement durable à l'INRA, où il est directeur de recherche. Il est aussi directeur d'études à l'École des hautes études en sciences sociales (EHESS) de Paris.

⁴ Manuel Lantin, conseiller scientifique au Secrétariat du CGIAR, est titulaire d'un doctorat de phytogénétique. Avant de rejoindre le Secrétariat du CGIAR, il a été responsable de la recherche et de la formation au ministère de l'Agriculture des Philippines, président du département d'agronomie et directeur adjoint de l'Institut d'amélioration des plantes de l'Université des Philippines à Los Bagnos.