

## La cartographie de la population de IR64/« Azucena »

Emmanuel Guiderdoni,<sup>1</sup> Brigitte Courtois,<sup>2</sup> Ning Huang,<sup>3</sup> Susan R. McCouch,<sup>4</sup> Alain Ghesquière,<sup>5</sup> Mathias Lorieux,<sup>6</sup> Denis Filloux,<sup>7</sup> Laurence Albar,<sup>8</sup> Nour Ahmadi,<sup>9</sup> Denis Tharreau<sup>10</sup> et Jean Loup Nottéghem<sup>11</sup>

Depuis quinze ans, la population de cartographie de variété indica-japonica dite « IR64-Azucena » jouit d'une popularité inégalée auprès des phytogénéticiens puisqu'elle permet de localiser plus facilement les gènes intervenant dans la résistance aux insectes ravageurs ainsi qu'aux maladies d'origine fongique, bactérienne ou virale, la tolérance abiotique au stress, l'architecture de la plante et la qualité du grain. Un projet en cours s'appuie sur une nouvelle lignée de populations consanguines recombinantes issues du croisement IR64-Azucena pour analyser la plasticité phénotypique du riz en phase précoce de développement de la plante, en comparant le pourcentage de répartition de la biomasse entre racines et pousses, l'architecture de la plante et le rythme de développement selon trois scénarios de croissance: en carence de phosphore, sous stress osmotique et dans des conditions de culture hydroponique sous-optimales.

Un récent recensement des populations permanentes de riz servant à la cartographie génétique (Xu 2002), fait apparaître la population de lignées à haploïdes doublées (HD) issues du croisement entre le cultivar indica IR64 des bas-fonds et le cultivar traditionnel pluvial japonica « Azucena » comme la ressource la plus utilisée par les généticiens moléculaires du riz pour déchiffrer le contrôle génétique des grands caractères agronomiques de la céréale modèle. Le recours extensif à cette population au cours des 15 dernières années a permis à des scientifiques d'étudier le contrôle génétique de 56 caractères et de détecter 215 loci à effet quantitatif (quantitative trait loci ou QTL) sur les chromosomes du riz (Xu, 2002). L'isolement de certains de ces QTL est en cours. Nous allons rappeler ici les origines de la création de cette population et présenter les dernières informations qui ont été accumulées en utilisant cette ressource, depuis le début de la décennie 90.

### Développement de la ressource

De 1987 à 1989, un programme collaboratif a amené le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) et l'Institut international de recherche sur le riz (IRRI) à étudier dans quelle mesure la culture d'anthers pouvait appuyer les techniques classiques d'amélioration des plantes visant à exploiter les croisements entre les variétés de riz japonica et indica. En dépit de l'intérêt évident que présentent ces croisements, la stérilité fréquente et les ségrégations anormales constatées dans les hybrides de génération F1 et leurs descendances ainsi que la lente fixation et faible fréquence des recombinants ont en effet longtemps limité leur usage dans les programmes d'amélioration des plantes. Ce manque de recombinants utiles a été imputé à l'action combinée des gènes de développement des gamétophytes et des sporophytes, provoquant la létalité de certains produits de la méiose et de combinaisons d'allèles et conduisant respectivement à une stérilité du pollen et une moindre viabilité des descendances.

L'objectif de ce projet était d'établir s'il était ou non possible, à l'aide d'une culture *in vitro* d'anthers contenant des gamétophytes immatures (microspores) de sauver des recombinants utiles qui auraient été perdus *in vivo* dans les premières générations consanguines des croisements japonica/indica, à cause de l'action des gènes de stérilité. Des marqueurs biochimiques (isoenzymes) ont servi à comparer l'étendue de la sélection gamétique dans des matériels issus de la culture d'anthers et d'autofécondation, en détectant les ségrégations biaisées et les liaisons artificielles entre gènes d'isozymes.

Les résultats de la recherche, issus de l'analyse d'un jeu limité de marqueurs biochimiques, ont montré que la sélection des gamètes était comparable entre produits de l'autofécondation et matériels dérivés des microspores, ce qui donne à penser que la dégénérescence des produits de méiose s'était produite à un stade précoce de la gamétogénèse, avant l'étape du microspore mononucléé.

Pour autant, une issue positive du projet a été de démontrer que, lorsque l'on croise des cultivars tropicaux japonica et des cultivars de bas-fond indica, la sélection gamétique semble être neutre en terme de différenciation japonica et indica (Guiderdoni 1991). De plus, les hybrides de génération F1 entre japonicas tropicaux et indicas des bas-fonds présentent des fertilités polliniques et paniculaires élevées et se prêtent bien à la culture des anthers en alliant à la grande

faculté de callogenèse du parent japonica le potentiel embryogène du parent indica (Guiderdoni et al. 1992). Ces résultats démontrent l'utilité de cultiver des anthères d'hybrides de japonica et d'indica des bas-fonds pour tirer, sans difficulté, du matériel homozygote à des fins d'amélioration des plantes ou d'études génétiques.

À la fin des années 80, l'utilisation des polymorphismes de la longueur des fragments de restriction enzymatique (restriction fragment length polymorphisms ou RFLP) comme marqueurs moléculaires, a permis de dresser la première carte moléculaire des chromosomes de riz à partir d'une population de cartographie de génération F2 (McCough et al. 1988). Cette avancée a aussi souligné la nécessité de développer, sans tarder, des populations de cartographie permanentes issues de croisements de parents présentant un degré élevé de polymorphisme moléculaire. Il apparut rapidement évident que les populations de lignées fixes issues de la culture d'anthères d'hybrides de japonica x indica constitueraient des matériels tout à fait appropriés pour cartographier, au plan moléculaire, les gènes contrôlant des caractères d'intérêt agronomique, compte tenu des caractères morphologiques contrastés et du haut degré de polymorphisme moléculaire généralement observé entre les parents.

En 1989, dans le cadre d'un projet de collaboration, le CIRAD et l'IRRI établissent une population de 210 haploïdes spontanément doublés par culture d'anthères d'hybrides de génération F1 entre le cultivar prisé des bas-fonds indica IR64 et le cultivar parfumé, tropical japonica de haut plateau « Azucena » (figure 1). L'hybride F1 possède 83 % de fertilité de pollen et 90 % de fertilité paniculaire et se prête bien à la culture d'anthères (Guiderdoni et al. 1992) tandis que les parents présentent un haut degré de polymorphisme moléculaire et des caractères contrastés (notamment en termes de hauteur, tallage, système racinaire, tolérance à la sécheresse et à l'aluminium, résistance à des isolats spécifiques de pyriculariose, flétrissement bactérien des feuilles, résistance aux virus et aux insectes ravageurs).

### Établissement de la carte génétique

Dans le cadre de travaux menés conjointement au CIRAD, à l'Institut de recherche pour le développement (IRD) en France, à l'IRRI aux Philippines et à l'université Cornell aux États-Unis, une population de cartographie noyau de 105 à 135 lignées d'haploïdes doublés (HD) a servi à dresser la carte de liaison génétique à partir du croisement entre IR64 et « Azucena ». Une étude de l'IRRI menée à l'aide d'un jeu de 146 marqueurs RFLP montre que 50,2 % des allèles viennent des parents indica et 49,8 % des parents japonica (Huang et al. 1996), confirmant une contribution bien équilibrée du génome des deux parents dans la génération de la population que les données d'isosymes suggéraient déjà. Cette première étude RFLP a été enrichie à l'IRRI par 80 marqueurs de séquences répétées en tandem (simple sequence repeat ou SSR) (Chen et al. 1997) et 208 marqueurs AFLP (polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) (Maheswaran et al. 1997). Plus tard, la carte génétique existante se trouva enrichie de plus de 500 nouveaux marqueurs microsatellites qui avaient été identifiés en cherchant les séquences de riz accessibles au public et qui présentaient un polymorphisme entre les variétés IR64 et « Azucena ». La carte microsatellite actuelle du riz a maintenant une densité moyenne d'un marqueur SSR tous les 4 cM (Temnykh et al. 2001).

Entre 1997 et 2000, un sous-ensemble de 107 lignées a également été utilisé dans le cadre du projet de cartographie des graminées EGRAM, une initiative financée par la Commission européenne. Le but de ce projet était d'élaborer divers outils applicables au riz (populations, bibliothèques d'ADN) en vue de faciliter, par la cartographie comparative, l'accès à des gènes utiles pour les céréales et les fourrages d'Europe, en particulier les gènes de résistance à la maladie. Ce projet a permis d'ancrer 61 cADN de maïs, de blé, d'orge, d'avoine, de manioc et de canne à sucre sur la carte de liaison. D'autres gènes candidats de riz, d'orge et de maïs intervenant, à la fois, dans la reconnaissance des pathogènes (analogues du gène de résistance) et dans la défense générale de la plante (gènes de défense potentiels) ont aussi été intégrés, depuis peu, dans le cadre cartographique IR64/ « Azucena » pour tester leur association aux caractères de résistance du riz à la pyriculariose, au flétrissement bactérien des feuilles, à la pourriture de la gaine et au virus du nanisme herbacé (Ramalingam et al. 2003).



Figure 1: IR64 (en haut) et Azucena (en bas) et leur hybride F1 (au centre)

Au titre du projet EGRAM, la taille de la population utilisée pour la cartographie fine a été portée à 300 lignées de descendance unipare (SSD) et 500 lignées HD. À partir de ces lignées, on a défini et géotypé une deuxième population de 178 lignes recombinantes à l'aide de 226 marqueurs SSR, créant ainsi un nouveau canevas de cartographie. Dans le cadre du Programme pour relever les défis « Génération », cette nouvelle carte sert à intégrer la plupart des QTL que la communauté du CGIAR a identifié (soit l'IRRI, le CIAT et l'ADRAO Association pour le développement du riz en Afrique de l'ouest), de pair avec les données physiques correspondantes des pseudomolécules pour faciliter l'étude de génomes (architecture et développement des plants, réponses au stress biotique et abiotique).

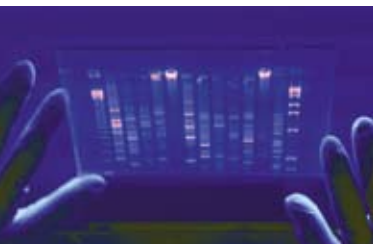
### La cartographie des caractères agronomiques et l'isolement de gènes les contrôlant

Les cartes du génome IR64/ « Azucena » ont permis de localiser les gènes / QTL impliqués dans la résistance aux insectes ravageurs, aux maladies fongiques, aux maladies d'origine bactérienne et virale, aux stress abiotiques, à l'architecture de la plante et à la qualité du grain. C'est en effet à l'aide de la population de cartographie IR64/ « Azucena » que l'on a localisé les QTL qui sous-tendent des caractères importants comme la hauteur du plant et la date d'épiaison (Yan et al. 1998; Li et al. 2003), les caractères intervenant dans la tolérance à la sécheresse (Yadav et al. 1997; Courtois et al. 2000; Zheng et al. 2000; Shen et al. 2001), le rendement (Courtois et al. 1995; Hittalmani et al. 2003), la résistance au nanisme herbacé (Alam and Cohen 1998; Ramalingam et al. 2003), la résistance au virus de la bigarrure jaune du riz (Ghesquière et al. 1997; Albar et al. 1998; Pressoir et al. 1998; Ahmadi et al. 2001; Ramalingam et al. 2003), la résistance au flétrissement bactérien des feuilles (Zhang et al. 1996; Ramalingam et al. 2003), la résistance à la pyriculariose (Ramalingam et al. 2003; Sallaud et al. 2003; Berruyer et al. 2003) et l'arôme du grain (Lorieux et al. 1996). Le clonage positionnel de l'allèle « Azucena », qui donne au grain son arôme, (Bourgis et al. en préparation) vient d'être terminé. Et c'est aussi avec des ressources IR64 x « Azucena » (Berruyer et al. 2003) que l'on a réalisé une cartographie fine de l'allèle IR64 au locus de résistance Pi33, qui correspond au gène ACE1 d'avirulence de *Magnaporthe grisea*.

### La contribution des populations IR64/ « Azucena » à la dissection du contrôle du développement et de la plasticité racinaire

De 1990 à 1995, le CIRAD et l'IRRI ont collaboré au programme sur l'écosystème du riz pluvial à l'IRRI. On s'est servi d'une population haploïde doublée pour détecter les QTL contrôlant des caractères morphologiques, notamment les caractères constitutifs de la racine, et des lignées quasi isogéniques (near isogenic lines ou NIL) ont été produites pour obtenir les QTL les plus efficaces pour le développement des racines (cf. article « Amélioration génétique du riz pluvial pour l'Asie », p. 44). Grâce à la séquence du génome riz qui est désormais disponible, on utilise aujourd'hui de nouveaux marqueurs microsatellites pour dresser une cartographie fine des zones significatives et le clonage positionnel du QTL qui détermine le poids des racines profondes sur le chromosome 9 est en cours.

Dans un projet financé par le Programme pour relever les défis « Génération », des chercheurs se servent de la nouvelle population de lignées recombinantes (recombinant inbred line ou RIL) du croisement IR64/ « Azucena » pour étudier la plasticité phénotypique du riz au début de la croissance du végétal en comparant la répartition de biomasse entre racines et tiges, l'architecture de la plante et le développement en fonction de trois scénarios de croissance: carence en phosphore, stress osmotique et dans des conditions de culture hydroponique optimales (témoin). Tant la carence en phosphore que le stress osmotique entraînent une plus grande affectation de biomasse à destination des racines plutôt que des tiges ainsi qu'une croissance et un développement accru des racines, si l'on tient compte des différences ontogénétiques entre les deux environnements. La répartition de la biomasse entre racines et pousses suit un déterminisme polygénique et cinq QTL ont été détectés sur cinq chromosomes différents. Parmi eux, deux présentent une expression constitutive, deux autres une expression inductible par le stress et, sur le dernier, l'on ne détecte que des variables de réponse relative. L'on a constaté que plusieurs autres QTL contrôlent la longueur maximale des racines, la biomasse des racines et le nombre de racines nodales. Il s'avère que les QTL qui peuvent être induits par carence de phosphore ou par stress osmotique ne se positionnent pas sur des segments chromosomiques communs. Des résultats qui laissent penser que la réponse du riz à ces contraintes fait intervenir des réseaux de régulation et de signalisation différents. Dans l'objectif de trouver des points communs entre ces réseaux, nous sommes en train d'étudier le lien entre biomasse et affectation du sucre aux racines et l'expression des gènes et le niveau d'activité de certains enzymes intervenant dans le métabolisme des sucres (comme les invertases et les sucrose synthétases). En effet, ces relations pourraient largement éclairer l'explication générique de la plasticité phénotypique des racines.



- <sup>1</sup> Emmanuel Guiderdoni, titulaire d'un doctorat, dirige l'équipe de développement adaptatif du riz qui fait partie de l'Unité mixte de recherche (UMR) Polymorphismes d'intérêt agronomique au CIRAD, à Montpellier, en France. De 1987 à 1989, il a été détaché en qualité de scientifique associé à la division de l'amélioration des plantes de l'IRRI.
- <sup>2</sup> Brigitte Courtois, titulaire d'un doctorat, dirige l'équipe de bioinformatique qui fait partie de l'UMR Polymorphismes d'intérêt agronomique au CIRAD, à Montpellier, en France. De 1993 à 1999, elle a été détachée en qualité de généticienne du riz pluvial à la division de l'amélioration des plantes et de biochimie de l'IRRI.
- <sup>3</sup> Ning Huang, titulaire d'un doctorat, est, pour l'heure, vice-président de la société de biotechnologies Ventria Bioscience, à Sacramento, en Californie (États-Unis). De 1992 à 1997, il fut le scientifique principal responsable du laboratoire de marqueurs moléculaires à la division de l'amélioration des plantes et de biochimie de l'IRRI.
- <sup>4</sup> Susan R. Mc Couch, titulaire d'un doctorat, est professeur à l'université de Cornell, à Ithaca, dans l'état de New York (États-Unis). De 1990 à 1992, elle fut la scientifique principale responsable du laboratoire de marqueurs moléculaires à la division de l'amélioration des plantes et de biochimie de l'IRRI.
- <sup>5</sup> Alain Ghesquière, titulaire d'un doctorat, est directeur de l'Unité mixte de recherche (UMR) 5096 « Génome et développement des plantes » regroupant l'IRD, le Centre national de la recherche scientifique (CNRS) et l'Université de Perpignan, à l'IRD-Montpellier. Il est par ailleurs responsable de la multiplication et de la caractérisation de la collection de mutants d'insertion ADN-t en collaboration avec le CIAT (Cali, Colombie).
- <sup>6</sup> Mathias Lorieux, titulaire d'un doctorat, généticien à l'IRD, a été détaché au CIAT (Cali, Colombie) pour assurer la multiplication des collections de mutants d'insertion ADN-t du programme Génoplante. Il dirige un projet du Programme pour relever les défis « Génération » sur la construction de lignées introgressées interspécifiques à partir de différentes espèces de riz.
- <sup>7</sup> Denis Filloux, est un expert de la culture des tissus de riz anciennement affecté à la station de Roujol du CIRAD (Petit Bourg, Guadeloupe, F.W.I.). Aujourd'hui, il est phytobiologiste et travaille pour l'unité de recherche Biologie et génétique des interactions plantes-pathogènes, à Montpellier, en France.
- <sup>8</sup> Laurence Albar, titulaire d'un doctorat, travaille à l'UMR 5096 « Génome et développement des plantes » sur l'identification des gènes de résistance à la panachure jaune du riz (RYMV). Elle a cloné le gène *eIF(Iso)4G* responsable de la forte résistance au RYMV.
- <sup>9</sup> Nour Ahmadi, titulaire d'un doctorat, généticien, possède une vaste expérience de l'amélioration du riz pour les écosystèmes pluviaux. Il dirige actuellement l'Unité de recherche « Création variétale et peuplements de riz » du CIRAD et supervise plusieurs projets de recherche menés conjointement par le CIRAD et les Centres du CGIAR.
- <sup>10</sup> Didier Tharreau, titulaire d'un doctorat, est un pathologiste du riz spécialiste de la pyriculariose, du département des cultures annuelles du CIRAD, qui travaille à l'Unité de recherche biologie et génétique des interactions plantes-pathogènes, à Montpellier, en France.
- <sup>11</sup> Jean Loup Nottéghem, titulaire d'un doctorat, pathologiste chevronné du riz, est professeur de pathologie végétale à l'École nationale supérieure agronomique de Montpellier et directeur de l'Unité de recherche biologie et génétique des interactions plantes-pathogènes, à Montpellier, en France.

## Références

- Ahmadi N., Albar L., Pressoir G., Pinel A., Fargette D. and Ghesquière A. (2001) Genetic basis and mapping of the resistance to Rice yellow mottle virus. III. Analysis of QTLs efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 103:1084–1092.
- Alam S.N. and Cohen M.B (1998) Detection and analysis of QTLs for resistance to the brown plant hopper *Nilaparvata lugens*, in a doubled-haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.* 97:1370-1379
- Albar L., Lorieux M., Ahmadi N., Rimbault I., Pinel A., Sy A.A., Fargette D. and Ghesquière A. (1998) Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus. I. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1145–1154.
- Berruyer R., Adreit H., Milazzo J., Gaillard S., Berger A., Dioh W., Lebrun M.H. and Tharreau D. (2003) Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. *Theor. Appl. Genet.* 107(6):1139–1147.
- Bourgis F., Lorieux M., Gherbi H., Tailliez E., Amabile I., Salse J., Delseny M., and Ghesquière A. Map-based cloning of the aroma gene in Azucena variety (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*). *Mol Genet Genomics* (en prep).
- Chen X., Temnykh S., Xu Y., Cho Y.G., and Mc Couch S.R. (1997) Development of microsatellite framework map providing genome wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.*, 95:533-567
- Courtois B., Huang N., and Guiderdoni E (1995) RFLP mapping of genes controlling yield components and plant height in an indica/japonica DH population of rice. In: Fragile lives in fragile ecosystems, Proc. Intl. Rice Research Conference, 13-17 Février 1995, IRRI, Los Banos, Philippines, pp 963-976
- Courtois B, McLaren G, Sinha PK, Prasad K, Yadav R and Shen L (2000) Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice. *Mol. Breeding* 6:56–66.

- Guideroni E. (1991) Gametic selection in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 81:406–412.
- Guideroni E., Luistro J., Galinato E. and Vergara G. (1992) Anther culture of tropical japonica/indica F1 hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 62:219–224.
- Hittalmani S., Huang N., Courtois B., Venuprasad R., Shashidhar H.E., Zhuang J.Y., Zheng K.L., Liu G.F., Wang G.C., Sidhu J.S., Srivantaneeyakul S., Singh V.P., Bagali P.G., Prasanna H.C., McLaren G. and Khush G.S. (2003) Identification of QTL for growth- and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theor. Appl. Genet.* 107(4):679–690.
- Huang N., Courtois B., Khush G.S., Lin H., Wang G., Wu P. and Zheng K. (1996) Association of quantitative traits loci for plant height with major dwarfism genes in rice. *Heredity* 77:130–137.
- Li Z., Yu S.B., Huang N., Courtois B., Hittalmani S., McLaren G., Khush G.S., Shashidhar H.E., Zhuang J.Y., Zheng L.K., Liu G.F., Wang G.C., Singh V.P., Sidhu J.S. and Srivantaneeyakul S. (2003) QTL x environment interactions in rice: I. Plant height and heading date. *Theor. Appl. Genet.* 108:141–153.
- Lorieux M., Petrov M., Huang N., Guiderdoni E. and Ghesquière A. (1996) Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. *Theor. Appl. Genet.* 93:1145–1151.
- Maheswaran M., Huang N., Sreerangasamy S.R., and Mc Couch S.R. (1997) Mapping quantitative trait loci associated with days to flowering and photoperiod sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed.*, 6:145-155
- McCouch S.R., Kochert G., Yu Z.H., Wang Z.Y., Khush G.S., Coffman W.R. and Tanksley S.R. (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815–829.
- Pressoir G., Albar L., Ahmadi N., Rimbault I., Lorieux M., Fargette D. and Ghesquiere A. (1998) Genetic basis and mapping of the resistance to the rice yellow mottle virus. II. Evidence of a complementary epistasis between two QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 97:1155–1161.
- Ramalingam J., Vera Cruz C.M., Kukreja K., Chittoor J.M., Wu J.L., Lee S.W., Baraoidan M., George M.L., Cohen M.B., Hulbert S.H., Leach J.E. and Leung H. (2003) Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16(1):14–24.
- Sallaud C., Lorieux M., Roumen E., Tharreau D., Berruyer R., Svestasrani P., Garsmeur O., Ghesquiere A. and Notteghem J.L. (2003) Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor. Appl. Genet.* 106:794–803.
- Shen L., Courtois B., McNally K.L., Robin S. and Li Z. (2001) Evaluation of near-isogenic lines introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theor. Appl. Genet.* 103(1):75–83.
- Temnykh S., DeClerck G., Lukashova A., Lipovich L., Cartinhour S., McCouch S. (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice: frequency, length variation, transposon associations and genetic marker potential. *Genome Res.* 11:1441–1452.
- Xu Y. (2002) Global View of QTLs: Rice as a Model. In: *Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding* (M.S. Kang, ed.). CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 109–133.
- Yadav R., Courtois B., Huang N. and McLaren G. (1997) Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a doubled-haploid population of rice. *Theor. Appl. Genet.* 94:619–632.
- Yan J., Zhu J., He C., Benmoussa M. and Wu P. (1998) Molecular dissection of developmental behaviour and plant height in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics*, 150: 1257-1265
- Zhang G., Angeles E.R., Abenes M.L.P., Khush G.S., Huang N. (1996) RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene xa-13 in rice. *Theor Appl Genet.*, 93:65-70
- Zheng H., Babu R.C., Pathan M.S., Ali M.L., Huang N., Courtois B. and Nguyen H.T. (2000) Quantitative trait loci for root penetration ability and root thickness in rice: comparison of genetic backgrounds. *Genome* 43:53–61.

## The IR64-Azucena mapping population

Emmanuel Guiderdoni,<sup>1</sup> Brigitte Courtois,<sup>2</sup> Ning Huang,<sup>3</sup> Susan R. McCouch,<sup>4</sup> Alain Ghesquière,<sup>5</sup> Mathias Lorieux,<sup>6</sup> Denis Filloux,<sup>7</sup> Laurence Albar,<sup>8</sup> Nour Ahmadi,<sup>9</sup> Denis Tharreau<sup>10</sup> and Jean Loup Nottéghem<sup>11</sup>

The IR64-Azucena indica-japonica mapping population has enjoyed unsurpassed popularity with breeders for a decade and a half, facilitating the localization of genes involved in resistance to insect pests and fungal, bacterial and viral diseases; abiotic stress tolerance; plant architecture; and grain quality. A current project is using a new recombinant inbred line population of the IR64-Azucena cross to investigate rice phenotypic plasticity during early vegetative growth by comparing root and shoot biomass partitioning, plant architecture and development under three growth conditions: phosphorus deficiency, osmotic stress and suboptimal hydroponic culture.

A survey of permanent rice populations used in genetic mapping ranked the population of doubled haploid (DH) lines derived from a cross between the lowland indica cultivar IR64 and the traditional upland japonica cultivar Azucena to be the most popular mapping resource used by rice molecular geneticists to decipher the genetic control of major agronomical traits in this model cereal crop (Xu 2002). The extensive use of this population over the last 15 years has allowed scientists to investigate the genetic control of 56 traits and to detect 215 quantitative trait loci (QTLs) on rice chromosomes (Xu 2002). The isolation of some of these QTLs is under way. We detail below how this population was originally developed and update the information that has been accumulated using this resource since the early 1990s.

### Development of the resource

From 1987 to 1989, a collaborative program between the Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) and the International Rice Research Institute (IRRI) investigated the potential of anther culture to help conventional breeding exploit crosses between japonica and indica varieties of rice. Despite the obvious interest in these crosses, their use in breeding programs has been hampered by the frequent sterility and abnormal segregations in the first filial generation (F1) hybrid and progenies, slow fixation and low frequency of recombinants. This lack of useful recombinants was attributed to the combined action of gametophytic and sporophytic developmental genes that killed some meiosis products and allele combinations, resulting respectively in pollen sterility and the low fitness of progenies.

The objective of this project was to determine whether *in vitro* culture of anthers containing immature gametophytes (microspores) would be able to rescue some of the useful recombinants that would have been lost *in vivo* in the first inbreeding generations of japonica-indica crosses because of these sterility genes. Biochemical markers (isozymes) were used to compare the extent of gametic selection in materials derived from anther culture and selfing by detecting skewed segregations and artificial linkages among isozyme genes.

The results showed that gametic selection deduced from the analysis of a limited set of biochemical markers was comparable among selfed progenies and microspore-derived materials. This suggested that the degeneration of meiosis products occurred at an early stage of gametogenesis, before the mononucleated microspore stage.

Nevertheless, a positive output of the project was to demonstrate that, when crosses between tropical japonica and lowland indica cultivars were used, the overall gametic selection appeared neutral with regards to the japonica and indica differentiation (Guiderdoni 1991). Moreover, F1 hybrids between tropical japonicas and lowland indicas were found to exhibit high pollen and seed fertility and a good amenability to anther culture by combining the high callusing ability of the japonica parent and the embryogenic potential of the indica parent (Guiderdoni et al. 1992). These results demonstrated the usefulness of anther culturing tropical japonica and lowland indica hybrids to readily derive homozygous materials for breeding and genetic studies.

The advent of restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) as molecular markers allowed the generation of the first molecular map of the rice chromosomes from an F2 mapping population in the late 1980s (McCouch et al. 1988). It also highlighted the need for rapidly developing permanent mapping populations derived from crosses between parents exhibiting high molecular polymorphism. It soon became apparent that populations of fixed lines derived through anther

culture of japonica  $\times$  indica hybrids would be very suitable materials for the molecular mapping of traits of interest because of the contrasting morphophysiological features and high molecular polymorphism generally observed between the parents.

The collaborative CIRAD-IRRI project established in 1989 a population of 210 spontaneously doubled haploids by anther culture of the F1 hybrid between the popular lowland indica cultivar IR64 and the aromatic tropical japonica upland cultivar Azucena (Figure 1). The F1 hybrid exhibited 83% pollen fertility and 90% seed fertility and was amenable to anther culture (Guideroni et al. 1992) while the parents exhibited high molecular polymorphism and contrasting traits (e.g., height, tillering, root system, drought and aluminum tolerance, and resistance to specific isolates of blast and bacterial leaf blight, viruses and insect pests).

### Establishment of the genetic map

In a joint effort combining CIRAD and the Institut de recherche pour le développement (IRD) in France, IRRI in the Philippines, and Cornell University in the United States, a core mapping population of 105-135 DH lines was used to establish a linkage map of IR64-Azucena. A study at IRRI using a set of 146 RFLP markers demonstrated that 50.2% of alleles came from the indica parent and 49.8% from the japonica parent (Huang et al. 1996). This confirmed the well balanced contribution of the genomes of the two parents in generating the population, a balance already suggested by isozyme data (Huang et al. 1996). This first RFLP study has been enriched at IRRI with 80 simple sequence repeat (SSR) markers (Chen et al. 1997) and 208 amplified fragment length polymorphism markers (Maheswaran et al. 1997). More than 500 new microsatellite markers identified by searching public rice sequences that showed polymorphism between IR64 and Azucena were later incorporated into the existing genetic map. The current rice microsatellite map now has an average density of one SSR marker for every 4 centiMorgans (Temnykh et al. 2001).

Between 1997 and 2000, a subset of 107 lines was also used in the European Commission-funded European Graminae Mapping (EGRAM) Project. This project aimed to develop various rice-based tools (i.e., populations and DNA libraries) to facilitate access, through comparative mapping, to useful genes in European cereal and forage crops, in particular disease-resistance genes. The project added 61 anchor cDNAs from maize, wheat, barley, oat, sorghum and sugarcane to the linkage map. Other candidate genes from rice, barley and maize involved in both pathogen recognition (resistance gene analogs) and general plant defense (putative defense response) were recently integrated in the IR64-Azucena mapping framework to test for association with resistance in rice to blast, bacterial blight, sheath blight and brown plant hopper (Ramalingam et al. 2003).

Under the EGRAM project, the size of the population used for fine mapping increased to 300 single seed descent (SSD) lines and 500 DH lines. From these lines, a second population of 178 recombinant lines has been defined and genotyped using 226 SSR markers, constituting a new mapping framework. Within the framework of the Generation Challenge Program of the Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR), this new map is currently used to integrate most of the QTLs identified by the CGIAR community (at IRRI, International Center for Tropical Agriculture and Africa Rice Center) with corresponding physical data of pseudomolecules to facilitate genomics studies on plant architecture and development and plant responses to biotic and abiotic stresses.

### Mapping agronomic traits and isolating genes of interest

The IR64-Azucena genome maps have allowed the localization of genes (as QTLs) involved in resistance to insect pests and fungal, bacterial and viral diseases; abiotic stress tolerance; plant architecture; and grain quality. The IR64-Azucena mapping population has been used to localize genes underlying such important traits as plant height and heading date (Yan et al. 1998; Li et al. 2003), drought tolerance-related traits (Yadav et al. 1997; Courtois et al. 2000; Zheng et al. 2000; Shen et al. 2001), yield (Courtois et al. 1995; Hittalmani et al. 2003), brown plant hopper resistance (Alam and Cohen 1998; Ramalingam et al. 2003), rice yellow mottle virus resistance (Albar et al. 1998; Pressoir et al. 1998; Ahmadi et al. 2001; Ramalingam et al. 2003),



Figure 1: IR64 (top) and Azucena (bottom) and their F1 hybrid (center)

bacterial leaf blight resistance (Zhang et al. 1996; Ramalingam et al. 2003), blast resistance (Ramalingam et al. 2003; Sallaud et al. 2003; Berruyer et al. 2003) and grain aroma (Lorieux et al. 1996). Positional cloning of the Azucena allele conferring grain aroma has been recently completed (Bourgis et al. in preparation). Fine mapping of the IR64 allele at the Pi33 resistance locus corresponding to *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 was also realized with the IR64 × Azucena resources (Berruyer et al. 2003).

### How IR64-Azucena populations contribute to dissecting root development and plasticity

Between 1990 and 1995, CIRAD and IRRI collaborated on breeding at IRRI for the upland rice ecosystem. The double haploid population was used to detect QTLs controlling morphological traits (particularly constitutive root traits), and near isogenic lines (NILs) were produced for the most effective root development QTLs (see *Genetic improvement of upland rice for Asia* on page 39 of this volume). Drawing benefits from the availability of the rice sequence, new micro-satellite markers are currently being used to fine-map the significant areas and positional cloning of the deep root weight QTL on chromosome 9.

A project currently supported by the Generation Challenge Program is using the new recombinant inbred line population of the IR64-Azucena cross to investigate rice phenotypic plasticity during early vegetative growth by comparing root and shoot biomass partitioning, plant architecture and development under three growth conditions: phosphorus deficiency, osmotic stress and suboptimal hydroponic culture (control). Both phosphorus deficiency and osmotic stress caused higher allocation of biomass to roots over shoots and enhanced root growth and development when the ontogenetic differences between environments were taken into account. Biomass partitioning between roots and shoots was found to be under polygenic determinism, and five QTLs were detected on five different chromosomes. Among them, two had a constitutive expression, two had inducible stress-related expression and the last was detected only for relative response variables. Several other inducible QTLs were detected controlling root maximum length, root biomass and the number of nodal roots. Inducible QTLs related to either phosphorus deficiency or osmotic stress were found not to share common chromosomal segments. These results suggest that the response of rice to these stresses involves different regulation and signaling networks. Looking for common points between these networks, we are currently investigating relationships between biomass and sugar allocation to roots, gene expression and the activities of some enzymes (e.g., invertases and sucrose synthase) involved in sugar metabolism. These relationships could be of major importance for providing a generic explanation for root phenotypic plasticity.



<sup>1</sup> Emmanuel Guiderdoni, PhD, is leader of the rice adaptation development team at the Polymorphisms of Agronomical Interest research unit of the Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) in Montpellier, France, and was, from 1987 to 1989, visiting scientist in plant breeding at the International Rice Research Institute (IRRI).

<sup>2</sup> Brigitte Courtois, PhD, is leader of the bioinformatics team of the Polymorphisms of Agronomical Interest research unit of CIRAD in Montpellier, France, and was, from 1993 to 1999, an upland rice breeder at IRRI.

<sup>3</sup> Ning Huang, PhD, is vice president of the biotech company Ventria Bioscience in Sacramento, California, USA, and was, from 1992 to 1997, senior scientist in charge of the molecular marker laboratory at IRRI.

<sup>4</sup> Susan R. McCouch, PhD, is a professor at the University of Cornell in Ithaca, New York, USA, and was, from 1990 to 1992, senior scientist in charge of the molecular marker laboratory at IRRI.

<sup>5</sup> Alain Ghesquière, PhD, is a rice molecular geneticist; leader of the rice team in the Genome and Plant Development research unit of the Institut de recherche pour le développement (IRD) in Montpellier, France; and frequent collaborator with IRRI, International Center for Tropical Agriculture (CIAT by its Spanish acronym) and Africa Rice Center (WARDA).

<sup>6</sup> Mathias Lorieux, PhD, is an IRD rice molecular geneticist currently assigned to the rice program of CIAT in Colombia.

<sup>7</sup> Denis Filloux is a former rice tissue culturist at CIRAD's Roujol outreach station in Guadeloupe and now a cell biologist at the Biology and Genetics of Plant Pathogen Interactions research unit at Montpellier, France.

<sup>8</sup> Laurence Albar, PhD, is an IRD rice molecular geneticist in the Genome and Plant Development research unit in Montpellier, France.

<sup>9</sup> Nour Ahmadi, PhD, is a rice breeder and geneticist and head of the Rice-Based Systems research unit in CIRAD's Annual Crop Department in Montpellier, France.

<sup>10</sup> Didier Tharreau, PhD, is a rice pathologist in the Biology and Genetics of Plant Pathogen Interactions research unit in CIRAD's Annual Crop Department.

<sup>11</sup> Jean Loup Nottéghem, PhD, is a senior rice pathologist, professor of plant pathology at the National Agronomy School of Montpellier, and head of the Biology and Genetics of Plant Pathogen Interactions research unit in CIRAD's Annual Crop Department.



## References

- Ahmadi N, Albar L, Pressoir G, Pinel A, Fargette D, Ghesquière A. 2001. Genetic basis and mapping of the resistance to Rice yellow mottle virus, III: Analysis of QTLs' efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 103:1084-1092.
- Alam SN, Cohen MB. 1998. Detection and analysis of QTLs for resistance to the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens*, in a doubled haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.* 97:1370-1379
- Albar L, Lorieux M, Ahmadi N, Rimbault I, Pinel A, Sy AA, Fargette D, Ghesquiere A. 1998. Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus, I: QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology. *Theor. Appl. Genet.* 97:1145-1154.
- Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH, Tharreau D. 2003. Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. *Theor. Appl. Genet.* 107(6):1139-1147.
- Bourgis F, Lorieux M, Gherbi H, Tailliez E, Amabile I, Salse J, Delseny M, Ghesquière A. Map-based cloning of the aroma gene in Azucena variety (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*). *Mol. Genet. Genomics* (in preparation).
- Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, and McCouch SR. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.*, 95:533-567.
- Courtois B, Huang N, Guiderdoni E. 1995. RFLP mapping of genes controlling yield components and plant height in an indica/japonica DH population of rice. In: *Fragile lives in fragile ecosystems*, Proc. Intl. Rice Research Conference, 13-17 February 1995, IRRI, Los Baños, Philippines, pp 963-976.
- Courtois B, McLaren G, Sinha PK, Prasad K, Yadav R, Shen L. 2000. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice. *Mol. Breeding* 6:56-66.
- Guiderdoni E. 1991. Gametic selection in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 81:406-412.
- Guiderdoni E, Luistro J, Galinato E, Vergara G. 1992. Anther culture of tropical japonica/indica F1 hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 62:219-224.
- Hittalmani S, Huang N, Courtois B, Venuprasad R, Shashidhar HE, Zhuang JY, Zheng KL, Liu GF, Wang GC, Sidhu JS, Srivantaneeyakul S, Singh VP, Bagali PG, Prasanna HC, McLaren G, Khush GS. 2003. Identification of QTL for growth- and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theor. Appl. Genet.* 107(4):679-690.
- Huang N, Courtois B, Khush GS, Lin H, Wang G, Wu P, Zheng K. 1996. Association of quantitative traits loci for plant height with major dwarfism genes in rice. *Heredity* 77:130-137.
- Li Z, Yu SB, Huang N, Courtois B, Hittalmani S, McLaren G, Khush GS, Shashidhar HE, Zhuang JY, Zheng LK, Liu GF, Wang GC, Singh VP, Sidhu JS, Srivantaneeyakul S. 2003. QTL x environment interactions in rice, I: Plant height and heading date. *Theor. Appl. Genet.* 108:141-153.
- Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E, Ghesquière A. 1996. Aroma in rice: Genetic analysis of a quantitative trait. *Theor. Appl. Genet.* 93:1145-1151.
- Maheswaran M, Huang N, Sreerangasamy SR, McCouch SR. 1997. Mapping quantitative trait loci associated with days to flowering and photoperiod sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed.*, 6:145-155
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SR. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829.
- Pressoir G, Albar L, Ahmadi N, Rimbault I, Lorieux M, Fargette D, Ghesquiere A. 1998. Genetic basis and mapping of the resistance to the rice yellow mottle virus, II: Evidence of a complementary epistasis between two QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 97:1155-1161.
- Ramalingam J, Vera Cruz CM, Kukreja K, Chittoor JM, Wu JL, Lee SW, Baraoidan M, George ML, Cohen MB, Hulbert SH, Leach JE, Leung H. 2003. Candidate defense genes from rice, barley and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16(1):14-24.
- Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Ghesquiere A, Nottoghem JL. 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor. Appl. Genet.* 106:794-803.
- Shen L, Courtois B, McNally KL, Robin S, Li Z. 2001. Evaluation of near-isogenic lines introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theor. Appl. Genet.* 103(1):75-83.

- Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice: Frequency, length variation, transposon associations and genetic marker potential. *Genome Res.* 11:1441-1452.
- Xu Y. 2002. Global View of QTLs: Rice as a model. In: *Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding* (Kang MS, ed.). CABI Publishing, Wallingford, UK. pp 109-133.
- Yadav R, Courtois B, Huang N, McLaren G. 1997. Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a doubled haploid population of rice. *Theor. Appl. Genet.* 94:619-632.
- Yan J, Zhu J, He C, Benmoussa M, Wu P. 1998. Molecular dissection of developmental behavior and plant height in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics*, 150:1257-1265.
- Zhang G, Angeles ER, Abenes MLP, Khush GS, Huang N. 1996. RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene *xa-13* in rice. *Theor Appl Genet.*, 93:65-70.
- Zheng H, Babu RC, Pathan MS, Ali ML, Huang N, Courtois B, Nguyen HT. 2000. Quantitative trait loci for root penetration ability and root thickness in rice: Comparison of genetic backgrounds. *Genome* 43:53-61.



# LA FRANCE ET LE CGIAR:

DES RESULTATS 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,<sup>1</sup> Emile Frison,<sup>2</sup> Bernard Hubert<sup>3</sup> et Manuel Lantin<sup>4</sup>.

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.

---

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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.

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> 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.