ECOLE NATIONALE SUPERIEUSE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEUSE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Ecole doctorale: Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement

Spécialité : Biologie Intégrative des plantes

Présentée et soutenue publiquement par :

Thi Thu Thuy NGUYEN

Le 4 Juin 2013

Analyse génétique et cellulaire de la résistance du riz à l'agent pathogène Magnaporthe oryzae en présence de fertilisation azotée.

JURY

M. Jean-Benoit MOREL (Directeur de Recherche à l'INRA de Montpellier), Directeur de thèse

Mme Elsa BALINI (Maître de conférences à Montpellier SupAgro), Co-directeur de thèse

Mme Fagard MATHILDE (Chargé de recherche à l'INRA de Versailles), Rapporteur

M. Jacques LEGOUIS (Chargé de recherche à l'INRA de Versailles), Rapporteur

M. Pierre CZERNIC (Professeur de l'Université Montpellier II), Examinateur

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

ECOLE NATIONALE SUPERIEUSE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEUSE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Ecole doctorale: Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement

Spécialité : Biologie Intégrative des plantes

Présentée et soutenue publiquement par :

Thi Thu Thuy NGUYEN

Le 4 Juin 2013

Analyse génétique et cellulaire de la résistance du riz à l'agent pathogène Magnaporthe oryzae en présence de fertilisation azotée.

JURY

M. Jean-Benoit MOREL (Directeur de Recherche à l'INRA de Montpellier), Directeur de thèse

Mme Elsa BALINI (Maître de conférences à Montpellier SupAgro), Co-directeur de thèse

Mme Fagard MATHILDE (Chargé de recherche à l'INRA de Versailles), Rapporteur

M. Jacques LEGOUIS (Chargé de recherche à l'INRA de Versailles), Rapporteur

M. Pierre CZERNIC (Professeur de l'Université Montpellier II), Examinateur

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

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements à Jean-Benoit Morel et Elsa Balini - Directeurs de thèse, de m'avoir confié ce sujet de thèse et de m'avoir dirigée tout au long de ces trois années. Merci pour le temps qu'ils ont consacré à la correction de ce manuscrit et à leur grande disponibilité. J'ai beaucoup appris à votre contact.

Je remercie très sincèrement Fagard Mathilde et Jacques Legouis d'avoir accepté d'être rapporteurs ma thèse. Je suis très honoré que Pierre Czernic ait accepté de faire partie de mon jury.

Un grand merci à tous les collègues qui m'ont aidée et fait passer de bons moments dans ce laboratoire. Je pense en particulier à tous ceux de l'équipe 4 pour tous les bons conseils et remarques sur mon travail, en particulier Thomas Kroi et Judith Hirsch.

Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse qui se sont réunis à trois reprises pour commenter et recadrer mes travaux de recherche : Pierre Czernic, Pierre Roumet, Jean-Loup Nothgem et Didier Tharreau. Merci à vous pour votre conseil et votre disponibilité.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Loïc et Christophe, les serristes qui ont soigné avec dévouement mes plantes, croissements de riz et m'ont aidé à réaliser de nombreuses expériences dans les serre durant ces trois années.

Je tiens aussi à remercier mes collègues. Merci à Stella pour ta gentillesse et pour m'avoir fait découvrir les joies de la randonnée. La fête de Pâques chez toi m'a fait me sentir un peu en famille.

Merci à Corinne pour ton amitié qui m'a été tellement précieuse cette dernière année et pour une bonne vacance dans les Cévennes. Merci à aussi Véronique pour ton aide, ta gentillesse et ta disponibilité.

Je voudrais aussi remercier les amis qui ont travaillé avec moi brièvement, mais j'ai partagé quelques moments importants pendant ces trois ans. Joan pour ton amitié et pour m'avoir donné une sensation de chaleur pendant mes premières journées à BGPI. Merci aussi à Enrico pour ton aide, ta gentillesse et ta disponibilité.

Et merci à tous les autres thésards, stagiaires, post-docs et colocataires de bureau qui ont mis une bonne ambiance dans le laboratoire, Emilie, Bastien, Przemek, Imène, Sophie, Cécile, Amadine, Xavier, Odile, Enrique,… ainsi qu'aux autres thésards de BGPI.

Je remercie Marie Stéphanie et Martin Drucker de m'avoir encadrée dans les manips de cytologie, ainsi que pour votre aides dans l'analyse des photos.

Merci aussi à tous ceux qui ont mis l'ambiance au labo 48 (Joëlle, Henri, Katia, Sandrine…) et un grand merci en particulier à Rémy pour ton amitié ainsi que ta sympathie. Et enfin merci à Michel Amphoux et Marie-Ange pour votre aide et votre disponibilité.

J'adresse mes remerciements aux quelques amis que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés et avec qui j'ai passé de bon moments : Khong Ngan Giang, Ta Kim Nhung, Tran Tuan Tu, Phung Phuong Nhung, Pham Phuoc Dien, Tran Van Giang, Nguyen Vu Phong, Le Thi Van

Anh, Mathilde, Rocio. Merci à toi Giang Khong pour ton accueil et ton aide pendant mes premières journées à Montpellier.

Cela va de soi, je remercie avec grande émotion ma famille pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Elle m'a toujours encouragé à aller de l'avant dans la vie malgré la difficulté d'être loin de ses proches. Merci d'avoir été là pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Cette thèse est aussi la vôtre. Je voudrais remercier mes deux hommes Nguyen Tien Long et Nguyen Tien Minh qui vit une période pleine de difficultés. Je pense très fort à eux et espère pouvoir bientôt les voir. Je suis arrivée au bout et mon dernier *remerciement, c'est pour toi maman (Con cảm ơn Mẹ).*

Abréviations

ACE: Avirulence Conferring Enzyme 1

ACT: amino acid-binding

AlaAT : Alanine aminotransférase

ASN: Asparagine synthétase

ATM : Ammonium transporteurs

ATT: Aspartate aminotransférase

Avr: Avirulence

CC/LZ-NBS-LRR: Coiled-Coil/Leucine Zipper-Nucleotide Binding Site Leucine Rich Repeats

CEBIP : Chitin Elicitor Binding Protein

CSSL: Chromosomal Segment Substitution Lines

ETI: Effector- Triggered Immutity

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

Fd-GOGAT : ferrédoxine -Glutamate synthase

JA : Jasmonic acid

GCN2 : General control non-derepressible

GDH: Glutamate déshydrogénase

GOGAT: Glutamate synthase

GS: Glutamine synthétase

HR : Réponse Hypersensible

JA: Jasmonique

LTP: Lipids Transfer Protein

MAMP/PAMPs: Microbe/Pathogen Associated Molecular Patterns

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NH_4^+ : Ammonium

NiR : Nitrite réductase

NO_3^- : Nitrate

NR: Nitrate réductase

NRT : Nitrate transporté

NUE: Nitrogen Use Efficiency

PAL: Phenylalanine ammonia-lyase

PBZ: Probenazole

PR: Pathogenesis related

PRRs : Pattern Recognition Receptors

PTI: PAMP-Triggered Immunity

QTLs : Quantitative Trait Locus

SA : Salicylic acid

R: Resistance

TM : Transmembrane

TABLE DE MATIERES

Remerciements 2

Abréviations 4

TABLE DE MATIERES 6

LISTE DES FIGURES DE LA THESE 9

LISTE DES TABLEAUX DE LA THESE 10

Article 1: Figures et Tableaux 10

Article 2: Figures et Tableaux 11

INTRODUCTION 12

1. Présentation du pathosystème riz/ Magnaporthe oryzae 13

1.1. Le riz, plante agronomiquement importante 13
1.2. Magnaporhte oryzae agent causal de pyriculariose 15
1.2.1. Symptômes et dégâts 15
1.2.2. Biologie de Magnaporthe oryzae 17
1.3. Résistance du riz à Magnaporthe oryzae 17
1.3.1. La résistance préformée 17
1.3.2. Les défenses inductibles 19
1.3.2.1. La PTI chez le riz 19
1.3.2.2. L'ETI chez le riz 21

2. L'azote chez le riz 27

2.1. Le rôle essentiel de l'azote dans la fertilisation 27
2.1.1. Définition de la NUE (Nitrogen Use Efficiency) 29
2.1.2. Les études de la NUE chez le riz 29
2.2. Le métabolisme de l'azote chez le riz 29
2.2.1. Absorption de l'azote : Nitrate, Ammonium, Urée 31
2.2.2. Réduction du nitrate en ammonium. 31
2.2.3. Incorporation de l'ammonium dans les acides aminés. 33
2.3. L'interaction entre la fertilisation azotée et la pyriculariose. 40
2.3.1. Généralités sur l'effet de l'azote dans les interactions plantes/ pathogènes 40
2.3.2. L'effet de l'azote sur la pyriculariose 47
2.3.2.1. La fertilisation azotée augmente la pyriculariose au champ 47
2.3.2.2. L'effet de l'azote sur la pyriculariose est différent selon les variétés de riz 50
2.3.2.3. Quelles pistes déjà explorées pour expliquer l'effet de la fertilisation azotée sur la pyriculariose ? 50

PROJET DE THESE 54

PREMIERE PARTIE : Mise en place de la méthodologie et étude cytologique et moléculaire de l'interaction entre l'azote et la sensibilité à la pyriculariose du riz. 56

1. Introduction 57

2. Article 1: Nitrogen fertilization increases disease severity to rice blast fungus by affecting fungal pathogenicity but does not dampen plant defense 58

3. Compléments première partie 90

3.1. Etude de l'effet des substrats neutres sur la sensibilité du riz à Magnaporthe oryzae 90
3.2. Test de l'effet de l'engrais retard sur la sensibilité du riz à Magnaporthe oryzae 92

3.2.1. Matériel et méthode 92
3.2.2. Résultat 92
DEUXIEME PARTIE : Diversité et génétique de la sensibilité induite par la fertilisation azotée 95
1. Introduction 96
2. Matériels et méthodes 96
2.1. Matériel végétal 96
2.2. Phénotypage 98
2.3. Croisements 98
3. Analyse moléculaire des plantes F1 100
4. Introduction et résumé de l'article 2 100
5. Article 2: Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat 101
DISCUSSION 130
1. Caractérisation de la NIS : Une sensibilité accrue du riz en présence d'une fertilisation azotée 131
2. La résistance complète peut elle aussi être modifiée par la fertilisation azotée 132
3. Cartographie d'un locus du riz important pour la NIS : un lien possible entre NUE et NIS ? 133
4. Bilan des pistes à explorer pour expliquer l'effet de la fertilisation azotée sur la pyriculariose ? 134
5. Perspectives 134
ANNEXE 136
1. Protocole engrais retarde 136
2. Cultures, repiquage du riz 136
2.1. Culture du riz 136
2.2. Repiquage du riz 136
3. Culture, inoculation et conservation de Magnaporthe oryzae 137
3.1. Culture de Magnaporthe oryzae 137
3.2. Inoculation 137
3.2.1. Inoculation 137
3.2.2. Comptage lésion 139
4. Extraction ADN 139
5. Extraction ARN de feuille de riz pour expression par qPCR 139
6. Traitement DNAse et transcription inverse ARN extrais 140
7. Préparation d'un gel d'électrophorèse et migration 140
8. PCR avec marqueurs microsatellite 140
9. PCR quantitative en temps réel (RT-PCR) 141
10. Coloration de Magnaporthe oryzae dans cellule végétale 141

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 143
RESUME 154
ABSTRACT..... 154

LISTE DES FIGURES DE LA THESE

Figure 1 : Symptômes de la pyriculariose provoqués par Magnaporthe oryzae 14

Figure 2 : Cycle de Magnapother oryzae 16

Figure 3 : Développement du complexe biotrophe interfaciale (BIC) lors de l'invasion biotrophe des cellules de riz 16

Figure 4 : Phénotypes de résistance partielle 18

Figure 5: Le signal chitine et la résistance de plante au champignon 18

Figure 6: Phénotype de résistance complète 20

Figure 7: Schéma illustrant la résistance gène pour gène dans l'interaction riz/Magnaporthe oryzae. 20

Figure 8: Les principales classes de protéines codées par les gènes R chez les plantes 24

Figure 9: La relation entre PNUE (Physiological Nitrogen Use Efficiency) et RDW (Relative Dry Weight) dans différentes variétés de riz 28

Figure 10: Schéma du transport, de l'assimilation et de la remobilisation de l'ammonium et du nitrate dans la plante 30

Figure 11: Relation entre l'absorption de l'ammonium et du nitrate 32

Figure 12: Position des principaux gènes impliqués dans le métabolisme azoté chez le riz 35

Figure 13: Expression du NADH-GOGAT1 dans les tissus de riz 36

Figure 14: Expression de NADH-GOGAT2 dans les tissus de riz 37

Figure 15: Expression de Fd-GOGAT dans les tissus de riz 37

Figure 16: Voie de l'assimilation de l'azote 39

Figure 17: Les événements clés de la voie de transduction du signal activées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques 44

Figure 18: Relation entre l'azote et le processus de pénétration via l'appressorium 46

Figure 19: Effet du nombre et du temps de fertilisation sur la sensibilité du riz à Magnaporthe oryzae 49

Figure 20: Effet de la quantité d'azote et des variétés sur la sensibilité du riz à pyriculariose 49

Figure 21: Plantes de la variété Kasalath dans trois types de terreaux différents après 1 mois 92

Figure 22: Haut et milieu: Plantes sous 3 traitements d'engrais retard ; Bas : Symptômes des plantes inoculées avec Guy11 sous les 3 conditions d'engrais retard 95

Figure 23: Carte génétique schématique d'un exemple de lignées CSSL idéale du riz 98

Figure 24: Schéma de construction de lignes de substitution de segments chromosomiques (CSSLs) de la population Nipponbare et Kasalath du génome du riz 98

Figure 25: Marqueurs microsatellites utilisés pour la cartographie de la population CSSLs Nipponbare X Kasalath 100

Figure 26: Bilan des croissements pour faire la cartographie QTL 100

Figure 27: Echelle de symptôme 139

LISTE DES TABLEAUX DE LA THESE

Tableau 1: Les gènes de résistance du riz à la pyriculariose clonés 22

Tableau 2 : Les familles de protéine PR connues chez le riz 26

Tableau 3: Terminologies utilisées pour décrire la NUE chez les plantes 28

Tableau 4 : Les gènes du métabolisme de l'azote chez le riz 34

Tableau 5: Effet du niveau de fertilisation azotée sur la sévérité de quelques maladies 41

Tableau 6: Influence de l'azote sur le développement des maladies 42

Tableau 7: Coefficients de corrélation (r) entre la sévérité de pyriculariose sur feuille et différents paramètres 52

Tableau 8: Acides aminés dans le riz dans différentes conditions d'apport azoté 52

Tableau 9: Protocole de test de l'engrais retard 94

Tableau 10: Résultats de développement des plantes et de sensibilité à M. oryzae après différents apports en engrais retard au semis 94

Article 1: Figures et Tableaux

Figure 1. Nitrogen supply and rice blast disease in Nipponbare and Kasalath genotypes 64

Figure 2. Percentage of nitrate/ammonium and timing for nitrogen supply 66

Figure 3. Penetration and growth of M. oryzae in rice plants under different nitrogen regimes 68

Figure 4. Plant growth and total nitrogen content under variable nitrogen regimes 69

Figure 5. Defense gene expression in rice under different nitrogen regimes 71

Figure 6. Fungal gene expression in plants grown under different nitrogen regimes 73

Figure 7. Blast susceptibility under exogenous application of amino acids 75

Supplemental Figure 1. Nitrogen-induced susceptibility in Kasalath and Nipponbare 85

Supplemental Figure 2. Plant height under different nitrogen regimes 86

Supplemental Figure 3. Gene expression in Maratelli plants under different nitrogen regime 87

Supplemental Table 1: Protocol fertilization solution 88

Supplemental Table 2: Primers used in this study. 89

Supplemental Table 3: 90

Article 2: Figures et Tableaux

Figure 1. Nitrogen-induced susceptibility to wheat blast 107

Figure 2. Diversity of nitrogen-induced susceptibility in rice 109

Figure 3. Robustness of resistance genes under high nitrogen treatment 111

Figure 4. Defense gene expression triggered by the Pi1resistance gene under nitrogen treatment. 112

Figure 5. Mapping of a locus required for resistance under high nitrogen 114

Supplemental Figure 1. Nitrogen-induced susceptibility in CSSL4, 5 and 19 identifying the NIS1 locus. 127

Supplemental Table 1: NIS across rice and M. oryzae diversity 128

Supplemental Table 2: Recombinant lines establishing NIS1 on chromosome 1 129

Supplemental Table 3: Further mapping of the NIS1 locus 130

INTRODUCTION

1. Présentation du pathosystème riz/ Magnaporthe oryzae

1.1. Le riz, plante agronomiquement importante

Le riz est une céréale de la famille des poacées, cultivée dans les régions tropicales, sub-tropicales et tempérées chaudes. Le riz cultivé existe en de très nombreuses variétés, plusieurs milliers, qui ont été classées en deux sous-espèces: Japonica et Indica. La sous-espèce japonica regroupe elle-même les japonica tempérés et japonica tropicaux.

Le riz peut être cultivé de manière irrigué ou de manière pluviale comme les autres céréales (Khush 2005). Oryza sativa a été exporté et sa culture a été adaptée en Afrique de l'Ouest et en Amérique du Nord et du Sud au cours des sept derniers siècles (Chang 1984). Le riz est aussi cultivé en Europe du sud (Portugal, Espagne, France et Italie). Cependant, plus de 90% de riz est produit et consommé en Asie où 60% de la population mondiale vit (Khush 2005). Parmi les céréales, la production de riz occupe la plus forte proportion de terres, avec environ 154 millions d'hectare par an consacré à la riziculture, soit 11% de la superficie totale cultivée pour les céréales. C'est la première céréale mondiale pour l'alimentation humaine (Khush 2005) .

La production annuelle mondiale a augmenté de façon continue au cours des cinquante dernières années (+9,5 Mt/an) (FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2009)) passant de 215 millions de tonnes en 1961 à plus de 661 millions de tonnes en 2008. Il est prévu que la population mondiale, qui était de 6 milliards de personnes en 1990, atteindra 8 milliards en 2025 (Khush 2005) dont 83% prendront place dans les pays en développement. Face à cette estimation, la production de riz devra augmenter de plus de 40% en 2030 pour satisfaire la demande de croissance de la population sans affecter les ressources de base. Cette augmentation du rendement de la production en riz devra être menée avec moins de surface cultivée et de ressource en eau disponible dans le sol en raison de l'explosion démographique, de l'urbanisation et la progression de l'industrialisation ainsi qu'avec moins de main-d'oeuvre et une réduction de l'utilisation des produits chimiques (engrais, pesticides). Pour faire face à ces enjeux, il est indispensable de créer de nouvelles variétés de riz possédant non seulement un potentiel de rendement plus élevé et stable mais également des résistances durables aux stress biotiques (Khush 2005).

La principale maladie du riz en Asie tropicale est la pyriculariose provoquée par le champignon Magnaporthe oryzae.



Figure 1: Symptômes de la pyriculariose provoqués par Magnaporthe oryzae

Symptôme foliaire provoqué par la souche Guy11

Lésion sporulante sur la feuille (Photo K. Pham)

Symptôme sur le cou

Panicule de riz infectée

Dégâts provoqués au champ dans une parcelle expérimentale (Photo D. Tharreau)

1.2. *Magnaporhte oryzae* agent causal de pyriculariose

1.2.1. Symptômes et dégâts

Les symptômes provoqués par M. oryzae sont caractérisés par une apparition sur les feuilles de lésions en forme de losange blanc bordées de brun (Figure 1: Symptômes de la pyriculariose provoqués par Magnaporthe oryzae). Ces lésions provoquent une baisse de l'activité photosynthétique (Bastiaans 1991), une mauvaise circulation des éléments nutritifs et peuvent par conséquent causer la mort de la feuille. Toutefois, les feuilles ne sont pas les seuls organes qui peuvent être affectés. Les tiges, les pièces florales, les panicules et les graines sont aussi affectées. Les attaques sur les inflorescences ont des conséquences directes sur le rendement car elles réduisent le remplissage des grains (Katsube and Koshimizu 1970).

La pyriculariose du riz peut être particulièrement destructrice dans certaines conditions. Les pertes de rendement provoquées par la pyriculariose sont très variables en fonction des agrosystèmes et peuvent atteindre plusieurs millions de tonnes, soit 10% à 30% des récoltes, sachant que 10% des récoltes suffisent à nourrir 60 millions de personnes par an (Valent 1990). Dans certaines conditions environnementales et pratiques culturales on observe 100% de pertes (Cruz-Vazquez et al. 2007). Une culture en situation irriguée avec de forts intrants azotés est notamment favorable à son développement (Teng et al. 1991; Long et al. 2000b). Les riz en culture pluviale sont particulièrement sensibles à la maladie. En revanche, les riz irrigués en conditions tempérées et les riz cultivés en altitude sont moins sujets à cette maladie.

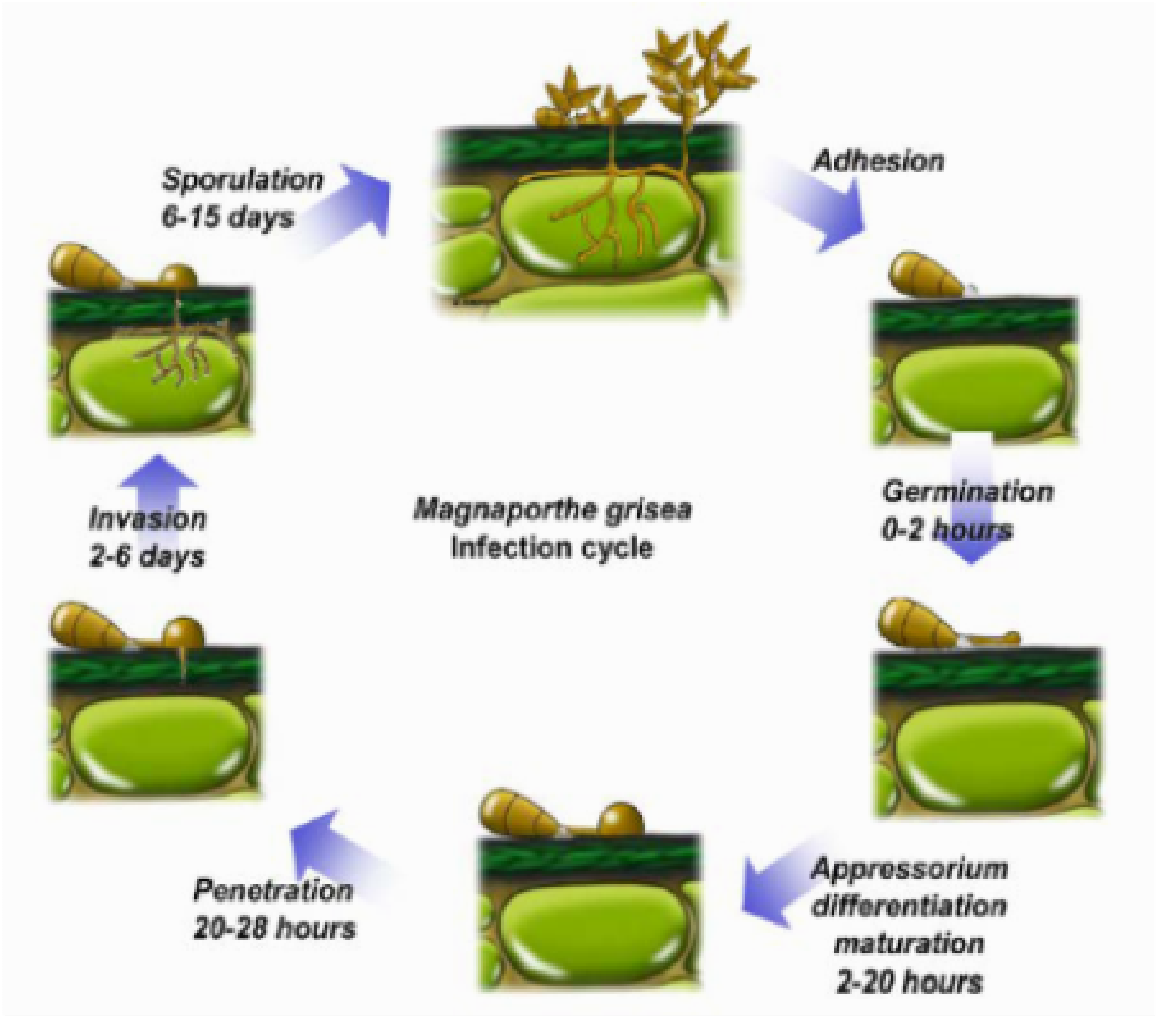


Figure 2 : Cycle de Magnaporthe oryzae (Ribot et al. 2008)

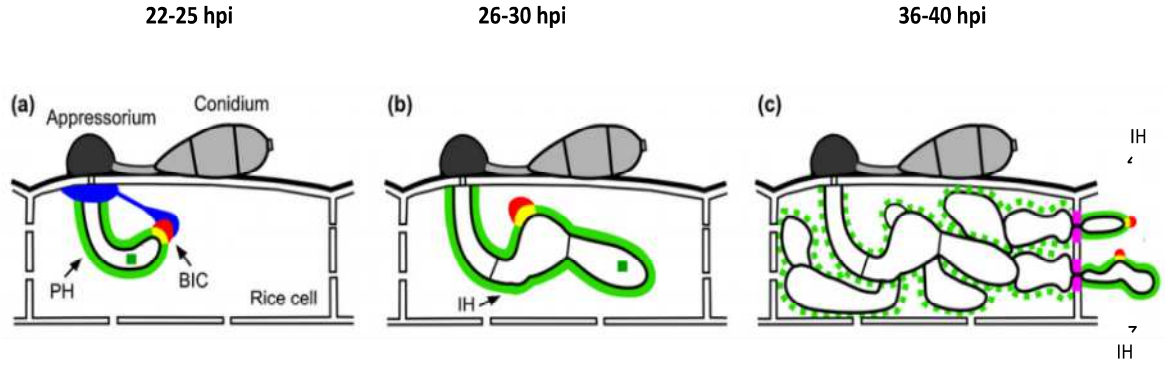


Figure 3 : Développement du complexe biotrophe inter facial (BIC) lors de l'invasion biotrophe des cellules de riz (Valent and Khang 2010). Sur la surface du riz, une conidie germe et produit un appressorium qui va pénétrer la cellule hôte par pression mécanique. A 20-25 hpi, l'hyphe primaire (PH) apparait, puis le les hyphes invasifs d'aspect bulbeux (IH) envahissent les cellules de riz, à 36-40 hpi, les hyphes IH gonflent légèrement, et traversent la paroi cellulaire pour se déplacer dans les cellules voisines.

1.2.2. Biologie de Magnaporthe oryzae

Le cycle infectieux qui est asexué (Figure 2) a été largement décrit (Ribot et al. 2008). A partir du mycélium, le champignon forme des conidiospores portant des conidies (spores asexuées). Ces conidies se détachent du conidiospore et sont transportées par voie aérienne. Lorsqu'elles tombent sur une feuille, elles s'attachent sur l'épiderme de la plante. En présence d'eau libre, les spores germent au bout de 2h et forment un organe de pénétration, l'appressorium (8h), qui permet par pression de perforer la paroi végétale (8-12h) et de produire un hyphe qui se développe dans les cellules, causant des lésions visibles (5 jours). Il existe deux phases dans le cycle de M. oryzae : une phase biotrophe et une phase nécrotrophe. Lors de la phase biotrophe, le champignon attaque et colonise rapidement les tissus végétaux pendant 3-4 jours (figure 3). La phase nécrotrophe ne débute que vers le cinquième jour concomitant avec l'apparition des premières lésions. Ces lésions produisent des spores pendant au moins 15 jours. Le maximum (2000 à 6000 spores/lésion/jour) est atteint 7 à 10 jours après le début de l'infection (Kato 1974). Les nouvelles spores sont ensuite dispersées par la pluie et le vent, sur des distances inferieures 3 mètres (Ou 1985).

1.3. Résistance du riz à *Magnaporthe oryzae*

Le riz présente deux types de systèmes immunitaires : préformé et inductible. Les défenses préformées ne nécessitent pas de stimulus, elles sont présentes et actives avant l'infection. Les défenses inductibles quant à elles sont déclenchées lors de la reconnaissance d'un agent pathogène.

1.3.1. La résistance préformée

La résistance préformée ou passive est le premier obstacle rencontré par l'agent pathogène lors de sa tentative d'invasion de la plante hôte. Cette résistance comprend des défenses physiques, telles que la paroi végétale et des défenses chimiques, notamment via l'activité antimicrobienne de composés naturellement produits par la plante. Cette résistance préformée peut aussi comprendre l'expression constitutive de gènes dits de défense. Le système de défense préformé est peu étudié mais on a pu montrer son importance pour la résistance du riz à M. oryzae. Notamment, les riz du sous-groupe des Japonica tropicaux présentent un fort niveau de défense préformé (Vergne et al. 2010).

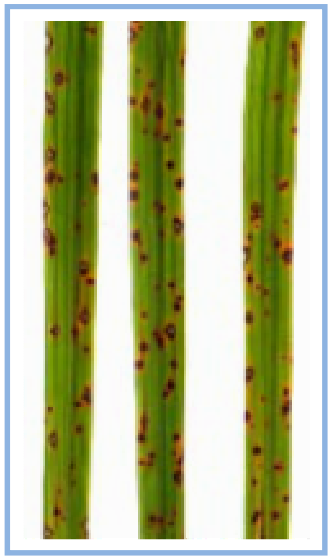


Figure 4: Phénotypes de résistance partielle.

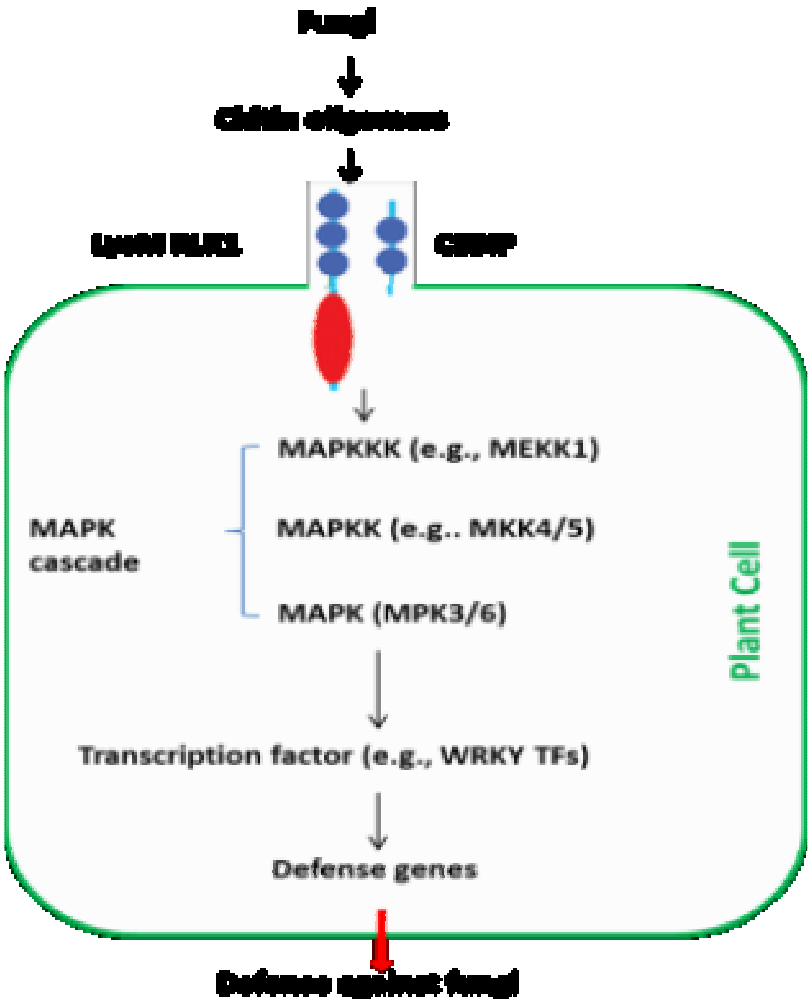


Figure 5: Le signal chitine et la résistance de plante au champignon (Wan J. 2008)

1.3.2. Les défenses inductibles

1.3.2.1. La PTI chez le riz

a) La résistance partielle

La résistance partielle est une résistance quantitative, définie par un phénotype et non par un mécanisme (Figure 4). Elle est caractérisée par une diminution du développement de l'agent pathogène lors de l'infection. C'est une résistance souvent considérée comme polygénique, à large spectre et potentiellement durable car non spécifique. Cependant certains cas de résistance partielle semblent toutefois être spécifiques (Bonman et al. 1989; Ballini et al. 2008a). De même cette résistance peut être monogénique. En effet, récemment un QTL de résistance partielle a été cloné, pi21, et il correspond à un gène codant pour une protéine de fonction inconnue a domaine riche en proline et avec un domaine de liaison aux métaux lourds (Fukuoka et al. 2009). La protéine codée par ce gène régulerait de façon négative la signalisation ayant lieu lors de la mise en place des défenses de la plante (Fukuoka et al. 2009).

La résistance partielle serait le résultat de la somme des résistances préformée, basale et gène-pour-gène. Cependant contrairement à la résistance complète, les interactions gène-pour-gène développées en résistance partielle sont souvent défectueuses.

b) Les récepteurs de le PTI

La résistance basale ou PTI (PAMP-Triggered Immunity) est définie par les défenses mises en place lors de la reconnaissance de motifs moléculaires généraux ou MAMP/PAMPs (Microbe/Pathogen Associated Molecular Patterns) par des récepteurs de la plante. C'est une résistance non-spécifique. La chitine est un composant majeur de la paroi cellulaire des champignons et est reconnue comme un MAMP (Kishimoto K 2011). Les traitements de chitine induisent chez le riz une augmentation de la résistance contre des pathogènes diverses (Wan J. 2008) (figure 5).

Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs de la plantes appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors) (Zipfel et al. 2006) (figure 5). Ces récepteurs appartiennent pour la plupart à la classe des Receptor Like Kinases (RLKs) comportant un domaine kinase intracellulaire et un domaine extracellulaire de type LRR ou LysM. Chez le riz, la PTI est activés par l'action conjointe des protéines OsCERK1 (chitin elicitor receptor kinase) et CEBIP (chitin elicitor binding protein) (Postel S 2009; Shimizu et al. 2010) (figure 6). Le silencing de CEBIP entraîne une réduction de la fixation de la chitine et des réponses de défense déclenchées par la chitine dans les cultures cellulaires de riz (Kaku H 2006). D'après des travaux effectués sur plante entière, le silencing du gène CEBIP entraine une sensibilité à Magnaporthe oryzae (Kishimoto K 2011).

Le gène WAK1 est identifié dans Arabidopsis thaliana fonctionne en tant que recepteur de DAMP (Damage Associated Molecular Pattern), molécules de la plante liberées lord de l'invasion de l'agent pathogène, tels que les fragments pariétaux ou de cuticule (Decreux et al. 2006)

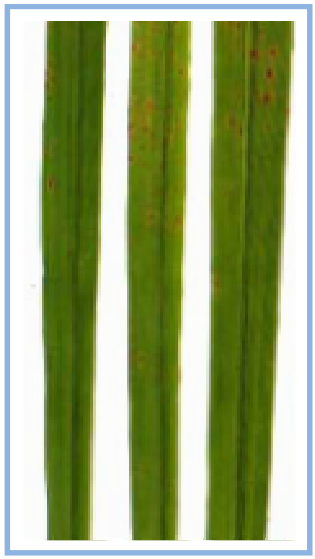


Figure 6: Phénotype de résistance complète

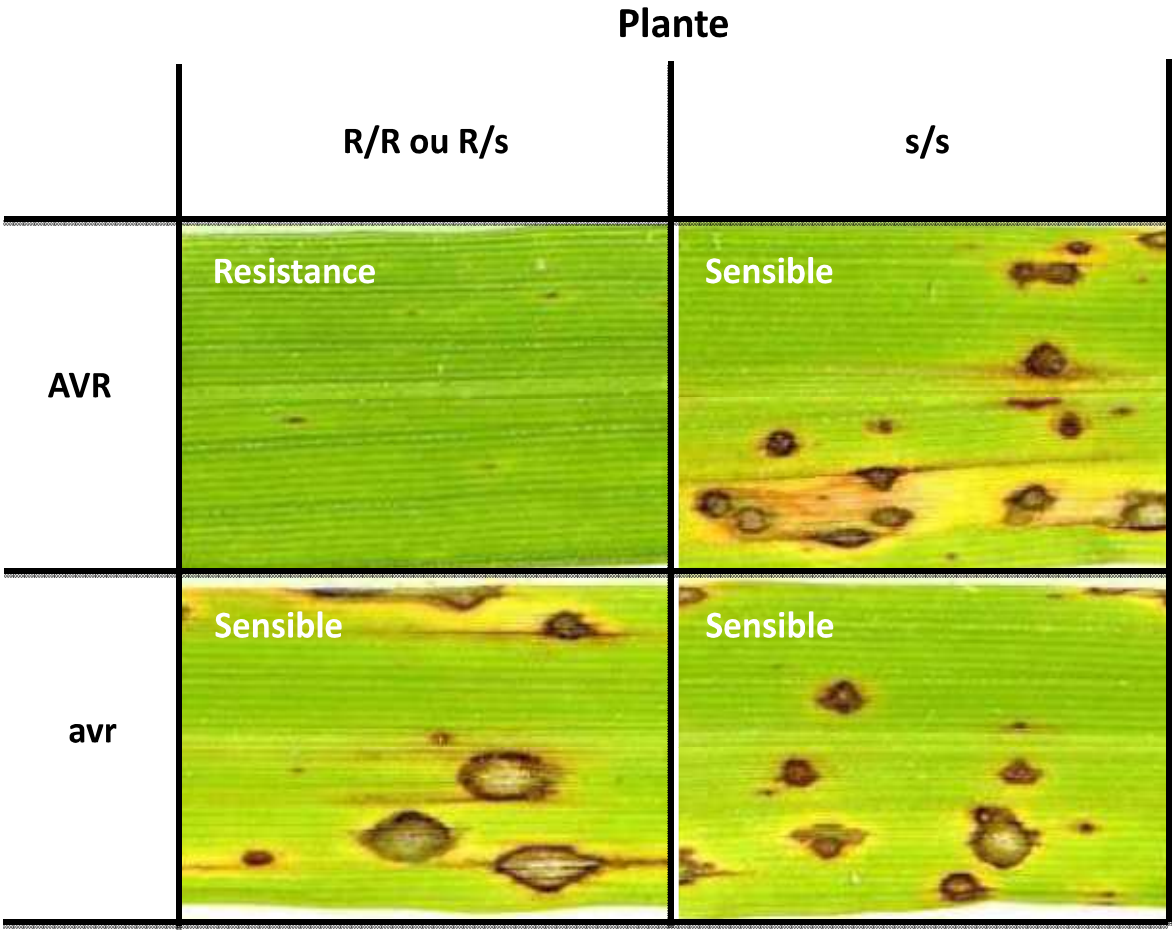


Figure 7: Schéma illustrant la résistance gène pour gène dans l'interaction riz/Magnaporthe oryzae.

En présence des deux allèles dominants de la protéine d'avirulence (AVR) et le gène de résistance (R), l'interaction est incompatible et entraine un phénotype de résistance de la plante. Dans le cas où l'un des deux gènes est l'allèle récessif (avr, r) ou absent, l'interaction est compatible et le phénotype de la plante sensible.

La surexpression du gène WAK1 chez A. thaliana augmente la résistance de la plante à Botrytis cinerea (Brutus et al. 2010).

Chez le riz, les 125 gènes codant des protéines WAK mais un seul gène OsWAK1 a été publié (Zhang et al. 2005). La surexpression de ce gène induit une très forte augmentation de la résistance à M.oryzae (Li et al. 2008).

Delteil et al a démontré que trois gènes du riz codant des WAK sont impliqués dans la résistance à M. oryzae (Thèse Delteil 2012). Les WAK ainsi que des récepteurs de la PTI pourraient donc jouer un rôle dans la résistance partielle en détectant des signaux généraux de la présence d'un agent pathogène.

1.3.2.2. L'ETI chez le riz

a) La résistance complète

La résistance complète s'observe lors d'une interaction incompatible. On lui associe habituellement le phénotype de HR (Réponse Hypersensible) (Figure 6). Certains cas ont cependant été relevés où une reconnaissance extrêmement rapide et robuste permet de stopper l'agent pathogène avant le développement de la HR (Greenberg and Yao 2004). Les mécanismes sous-jacents à la résistance complète sont ceux de l'ETI, ou effector-triggered immunity.

b) L'ETI chez le riz

Les plantes possèdent un second niveau de défense inductible, basé sur la reconnaissance d'effecteurs par une seconde classe de récepteurs du système immunitaire végétale appelés protéines de résistance (R) (Jones and Dangl 2006). La reconnaissance de ces effecteurs, alors appelées protéines Avr, active une résistance qualifiée d'ETI (Effector-Triggered Immutity). L'ETI aboutit en général à l'activation locale d'une forme de mort cellulaire programmée, la HR ou Réponse Hypersensible (Dodds PN 2010). La reconnaissance d'une protéine Avr par une protéine R suit le modèle gène-pour-gène énoncé par Flor en 1956. Selon cette théorie, les résistances spécifiques sont dues à des gènes de résistance (gène R), auxquels correspondent des gènes d'avirulence chez l'agent pathogène. Lorsqu'un organisme pathogène avirulent (Avr) infecte une plante résistante (R), la réaction est dite incompatible, et l'organisme pathogène ne se développe pas. Si l'un ou autre de ces gènes ou les deux gènes sont absents, l'argent pathogène peut se développer, et les symptômes de la maladie sont observés (figure 7). A ce jour, plus de 40 gènes d'Avr de Magnaporthe oryzae ont été identifiés (Mentlak TA. 2011) et huit ont été clonés : ACE1 (Bohnert et al. 2004); AVR-Pia, AVR-Pii, AVR-Pik (Yoshida et al. 2009); AVR-Pizt (Zhou et al. 2006; Li et al. 2009); AVR-Pita (Orbach et al. 2000); PWL2 (Sweigard et al. 1995); PWL1(Kang et al. 1995). Dans l'équipe, on utilise couramment trois de ces gènes d'avirulence (ACE1, Avr1-CO39 et Avr-Pia).

Nom du locus	Gènes confèrent la résistance	Chromosome	Référence	Domaine
Pit	Pit	1	Hayashi et al., 2010	NBS-LRR
Pis-h	Pis-h	1	Takahashi et al,. 2010	NBS-LRR
Pib	Pib	2	Wang et al., 1999	NBS-LRR
Pid3	Pid3	4	Shang et al., 2009	NBS-LRR
Pid-2	Pid-2	6	Chen et al., 2006	Récepteur lectin
Pi9	Pi9	6	Qu et al., 2006	NBS-LRR
Pi-2	Pi-2	6	Zhou et al., 2006	NBS-LRR
Pid3	Pid3	6	Shang et al., 2009	NBS-LRR
Piz-t	Piz-t	8	Zhou et al., 2006	NBS-LRR
Pi36	Pi36	8	Liu et al., 2007	NBS-LRR
Pikm	Pikm-1 et Pikm-2	9	Ashikawa et al., 2008	NBS-LRR
Pi5	Pi5-1 et Pi5-2	9	Lee et al., 2009	NBS-LRR
Pi54	Pi54	11	Shrama et al., 2005	NBS-LRR
Pi37	Pi37	11	Liu et al., 2007	NBS-LRR
Pia	RGA4 et RGA5	11	Okuyama et al., 2011	NBS-LRR
Pik	Pik-1 et Pik-2	11	Zhai et al., 2011	NBS-LRR
Pikp	Pikp-1 et Pikp-2	11	Yuan et al., 2010	NBS-LRR
Pita	Pita	12	Bryan et al., 2000	NBS-LRR

Tableau 1: Les gènes de résistance du riz à la pyriculariose clonés (Ballini et al. 2008a; Sharma et al. 2012) .

Avr1-CO39 est un des gènes d'avirulence étudié dans l'équipe (Ribot et al. 2012). Avr1-CO39 induit la résistance sur les cultivars du riz porteurs du locus de résistance Pi-CO39 (Chauhan et al. 2002). Ce locus a été cartographié sur le chromosome 11 de la variété CO39, contenant un cluster d'analogues de gènes R codant pour des protéines CC-NB-LRR. Le locus porteur d'AVR1-CO39 a été également cartographié dans la région télomérique du chromosome 1 de M. oryzae (Smith and Leong 1994).

AVR-Pia est perçu par le produit du gène de résistance Pia (Yoshida et al. 2009). La translocation d'AVR-Pia est montrée par des analyses d'induction de la mort cellulaire dans des protoplastes de riz. Le gèneAVR-Pia est situé sur les régions chromosomiques instable qui est variable selon les isolats (Yoshida et al. 2009).

Ce second système de reconnaissance qui déclenche l'ETI (Effector Triggered Immunity) est le plus étudié et le mieux connu. Les produits des gènes R peuvent être classés en fonction des domaines qu'ils contiennent et de leur organisation.

Cinq classes réceptrices de la résistance gène pour gène ont été définies. La classe des Sérine –Thréonine kinase, la classe des CC/LZ-NBS-LRR (coiled-coil/leucine zipper-nucleotide binding site leucine rich repeats), la classe des TIR-NBS-LRR, la classe des LRR-TM (Transmembrane) et la classe des LRR-TM-Sérine-Thréonine kinase (figure 8).

Dans la majorité des cas, les gènes de résistance codent ses protéines de type NBS-LRR. Ce sont des protéines cytoplasmiques avec un site de liaison aux nucléotides en amont d'une série de LRR (Nucleotide-Binding site, Leucine Rich Repeat proteine) (Caplan J.L 2008). On compte plus de 500 NBS-LRR chez le riz (Zhou et al. 2004), dont plus de 400 membres sont des protéines de type CC-NBS-LRR. Une centaine de gènes de résistances à M. oryzae a été cartographié chez le riz. (Ballini et al. 2008a; Sharma et al. 2012). Dix-neuf gènes de résistance à la Pyriculariose ont été clonés, 80% d'entre eux codent la protéine de type NBS-LRR (tableau 1) (Ballini et al. 2008b; Sharma et al. 2012) . A l'exception de Pid-2, tous les autres gènes de résistance à Magnaporthe oryzae codent des protéines NB-LRR (tableau 1).

Une autre classe de protéines R extracellulaire est aussi importante dans la résistance du riz, la classe des LRR-kinases. Cette classe de gènes, d'environ 220 membres chez le riz, peut être séparée en treize sous-familles en fonction des relations phylogénétique dans la séquence du domaine kinase (Dievart and Clark 2003). Le gène R du riz Pid2, qui permet la résistance à certains isolats de Magnaporthe oryzae, appartient à cette catégorie (Chen et al. 2006).

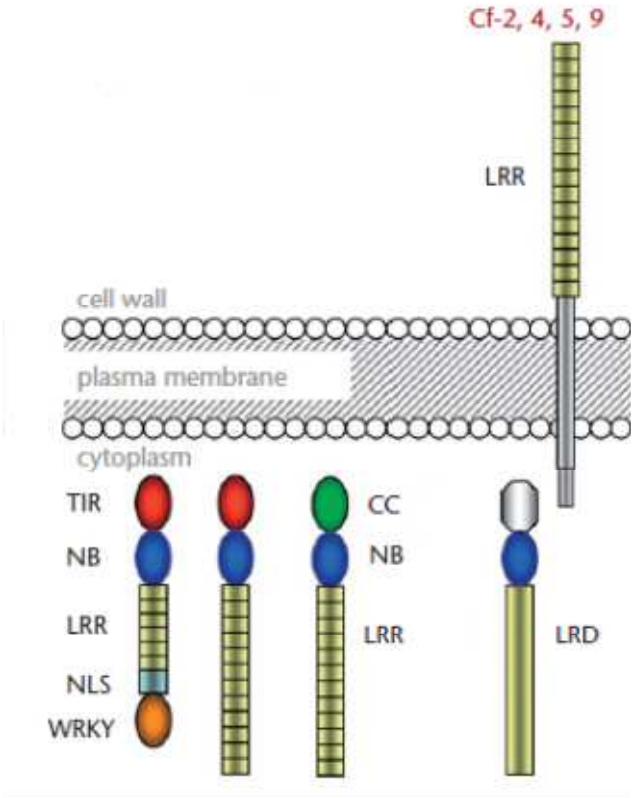


Figure 8: Les principales classes de protéines codées par les gènes R chez les plantes. Des protéines R sont représentés de manière schématique : CC (Coiled-Coil) ; TIR (Toll and Interleukin 1 Receptor like motif) ; NB (Nucleotide Binding) ; LRD (Leucine-Rich Domain) ; LRR (Leucine-Rich-Repeat) ; NLS (Nuclear Localization Signal) ; WRKY les facteurs de transcription des plantes, type B-lectin, structure similaire à un domaine PAN. (Hammond-Kosack K.E 2007).

c) Les régulateurs de la défense

Plus de 60 gènes régulateurs du riz impliqués dans la résistance contre différents agent pathogènes ont été identifiés. Ils peuvent être provisoirement attribués à quatre grandes étapes sur la voie de la résistance aux maladies: reconnaissance, signalisation, transcription et réponse de la défense (Delteil et al. 2010; Vergne et al. 2008).

Brassinolide (BL), une importante brassinostéroïde de régulation de croissance et de développement des plantes, joue également un rôle très important dans les réactions de défense du riz (Nakashita H et al. 2003). Le riz traité BL sont résistants à Magnaporthe oryzae et Xathomonas oryzae (Nakashita H et al. 2003).

D'autres part, les hormones comme l'acide abscissique (ABA), jasmonique l'acide (JA), et acide salicylique (SA) ont également été montré à jouer un rôle importante dans les réponses immunitaires de riz (Mei C et al. 2006; Jiang C.J et al. 2010). Par exemple, l'application de JA active l'expression de gènes de défense et l'induite de la résistance chez le riz contre M. oryzae (Mei C et al. 2006). ABA régule négativement les deux voies de défense basales et gène résistance du riz à M. oryzae (Jiang C.J et al. 2010). ABA interagit antagonisme avec la voie de signalisation SA dans l'interaction entre le riz et M. oryzae (Chen and Ronald 2011).

d) Protéine PR (pathogenesis related)

La transduction du signal aboutit à l'induction de l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines diverses, les PR, qui sont pour la plupart supposées jouer un rôle dans la défense.

L'accumulation de protéines PR est un des composants cruciaux du répertoire inductible des mécanismes de défense de la plante. Les protéines PR ont initialement été classées en 15 familles (tableau 2) (Van Loon L.C. 1999; Van Loon 2006; Vergne 2007). Quatre principales familles sont considérées comme ayant un rôle dans l'interaction avec Magnaporthe oryzae : PR1, PR2, PR10 et PR14.

Famille	Propriété	Nombre gène chez le riz	Exemples chez le riz
PR1	inconnu	2	OsPR1a et OsPR1b
PR2	β-1,3-glucanase	13	OsGNS1
PR3	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	5 familles multigéniques supposées nombreuse	OsPR3, OsPR4, RC24, Rcht2 et Cht-1-3
PR4	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII		
PR5	Thaumatin-like	3	OsPR5, pPIR2
PR6	Proteinase-inhibitor	5	OsBBPI, RBBI2-3, OsPIN
PR7	Endoproteinase	1	RSP1
PR8	Chitinase type III	cf PR3	cf PR3
PR9	Peroxidase	42	POX22, 3
PR10	Ribonuclease-like	6	PBZ1, RPR10b, JIOsPR10
PR11	Chitinase type I	cf PR3	cf PR3
PR12	Defensin	90	ABS
PR13	Thionin	1	OsThi1
PR14	Lipid-transfert protein	9	les 9, LTP1, LTP110
PR15	Oxalate oxidase	2	les2

Tableau 2 : Les familles de protéine PR connues chez le riz (Van Loon 2006; Vergne 2007)

2. L'azote chez le riz

2.1. Le rôle essentiel de l'azote dans la fertilisation

Afin d'atteindre un rendement optimal, l'agriculture moderne nécessite l'utilisation d'une fertilisation souvent sous la forme des trois éléments minéraux N, P et K (Azote, Phosphore et Potassium). En effet les éléments minéraux essentiels au bon développement de la plante sont fréquemment en quantité insuffisante dans les sols (Lacharme 2001). L'azote permet une croissance vigoureuse des plants de riz pendant la phase végétative et en particulier pendant la phase de tallage et au moment du remplissage des panicules. Un apport d'azote pendant cette phase se manifeste par un verdissement de la culture correspondant à un accroissement de la teneur en chlorophylle et donc un accroissement de la photosynthèse (Lacharme 2001). La plante de riz répond très fortement aux apports d'azote. Cela signifie qu'une fertilisation azotée bien réalisée donne des accroissements de rendements immédiats et visibles. Cependant, l'agriculture moderne utilise parfois la fertilisation azotée de manière excessive et l'usage des nitrates est aujourd'hui largement sujet à controverse.

Trois principales sources d'azotes sont utilisées pour la fertilisation du riz : l'urée $CO(NH_2)_2$, l'ammonium NH_4^+ et le nitrate NO_3^- (Morot-Gaudry 1997). Le nitrate est la principale source d'azote dans les sols (Marschner 1995). Cependant dans les sols irrigués, qui constituent la pratique culturale majoritaire pour la culture du riz, l'azote est principalement présent sous forme d'ammonium (Tabuchi et al. 2007). D'autre part, le riz restant une culture vivrière les petits agriculteurs a peu accès aux fertilisants minéraux et c'est donc plus souvent sous forme d'urée que se fait la fertilisation azotée.

Définition	Formule
Uptake efficiency (UpE)	UpE= (plant (or shoot) N content)/ (N supply)
Grain nitrogen use efficiency (NUE)	NUEgrain = (grain mass) / (N supply)
Utilization efficiency (UtE)	UtE= (grain mass)/ (plant (or shoot) N content)

Tableau 3: Terminologies utilisées pour décrire la NUE chez les plantes (Good et al. 2004) .

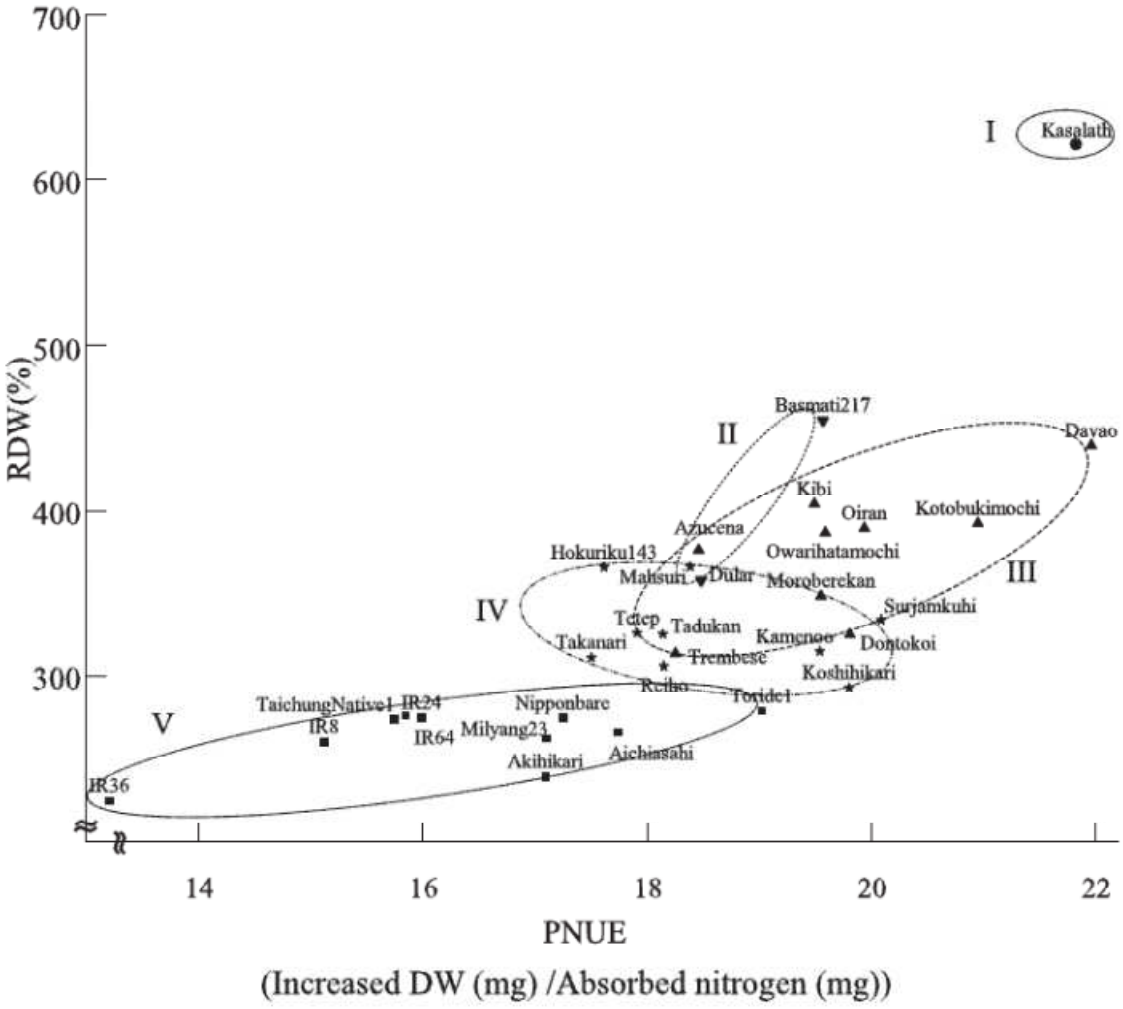


Figure 9: La relation entre PNUE (Physiological Nitrogen Use Efficiency) et RDW (Relative Dry Weight) dans différentes variétés de riz (Namai et al. 2009).

2.1.1. Définition de la NUE (Nitrogen Use Efficiency)

L'efficacité d'utilisation de l'azote (NUE) est un caractère agronomique très recherché actuellement (Xu et al. 2012). Elle peut être décomposée en deux facteurs: l'efficacité d'absorption et l'efficacité d'utilisation. L'efficacité d'absorption est la capacité de la plante à extraire l'azote du sol. L'efficacité d'utilisation est sa capacité à le transformer et à le remobiliser. Plusieurs formules sont utilisables pour mesurer la NUE (tableau 3).

2.1.2. Les études de la NUE chez le riz

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence une diversité phénotypique de la NUE chez le riz (Broadbent et al. 1987; Samonte et al. 2006; Inthapanya et al. 2000; Tirol-Padre et al. 1996). Notamment, une différence de réponse entre les deux sous espèce de riz aurait été mise en évidence (Koutroubas and Ntanos 2003a). Ce résultat a été confirmé sur une analyse de trente et une variétés choisies au sein des différentes sous espèces de riz cultivé (Namai et al. 2009). D'après ces résultats, la variété Kasalath possède une NUE particulièrement élevée, et les variétés Nipponbare, IR64, Moroberekan ont une NUE plus moyenne (figure 10). Ces variétés sont couramment utilisées au laboratoire et leur niveau de résistance partielle a été documenté (Vergne et al. 2010). Il pourrait être intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre la NUE et le niveau de résistance partielle du riz.

Puisqu'une diversité phénotypique a pu être observée chez le riz cela a pu permettre de cartographier ces phénotypes. Ainsi des QTLs (Quantitative Trait Locus) de NUE ont été identifiés sur les cartographies des populations de riz. Ces QTLs pourraient être expliqués par différents types de traits complexes, tels que l'architecture des racines, les transporteurs de nitrates, et certaines enzymes clefs du métabolisme azoté comme l'alanine aminotransférase (AlaAT) et la NADH-Glutamate synthase (NADH-GOGAT) (Xu et al. 2012). Chez les différentes plantes, plusieurs mutants avec des NUE variables ont été identifiés (Pathak et al. 2008). En particulier, un gène de l'orge codant pour une alanine amino-transférase (AlaAT) présente des résultats particulièrement encourageant, puisque des lignées de riz sur-exprimant ce gène possèdent en effet une très bonne NUE (Beatty et al. 2009).

Un autre gène candidat intéressant pour la NUE est le gène codant pour une enzyme clef du métabolisme azoté : la NADH-GOGAT (Yamaya et al. 2002; Andrews et al. 2004). Des lignées transgéniques NADH-GOGAT sur exprimant le gène ont montré une augmentation significative de rendement (Yamaya et al. 2002).

2.2. Le métabolisme de l'azote chez le riz.

L'azote est assimilé par la plante sous la forme nitrate (NO3-) ou ammonium (NH4+). Les plantes peuvent utiliser ces deux formes à la fois dans leur processus de croissance (Römheld and Marschner 1986).

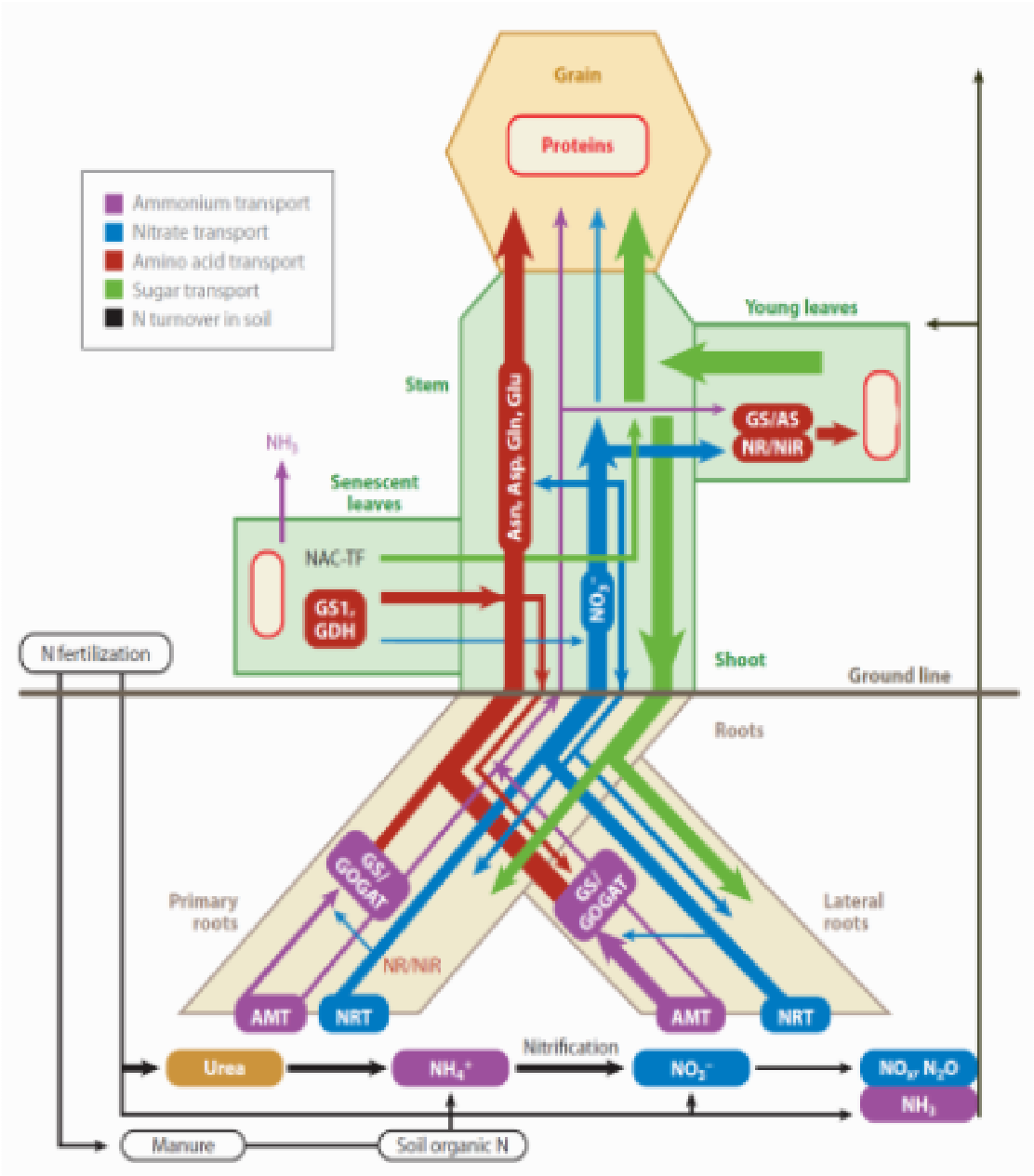


Figure 10: Schéma du transport, de l'assimilation et de la remobilisation de l'ammonium et du nitrate dans la plante (Xu et al. 2012).

2.2.1. Absorption de l'azote : Nitrate, Ammonium, Urée

Le nitrate est absorbé grâce à des transporteurs (NRT : nitrate transporter). Ces transporteurs membranaires sont codés par deux familles de gènes : NRT1 et NRT2. La plupart des membres de la famille NRT1 caractérisés à ce jour sont de faible affinité avec le nitrate et fonctionnent pour des concentrations élevées (1mM) tandis que les transporteurs de type NRT2 sont à forte affinité avec le nitrate et fonctionnent pour des concentrations faibles (500 µM) (Xu et al. 2012) (Figure 10). Chez le riz, plusieurs gènes transporteurs de nitrate ont été caractérisés (Xu et al. 2012).

L'absorption d'ammonium du sol est médiée par les transporteurs d'ammonium (AMT) grâce à des systèmes de transport à haute et basse affinité (Figure 11) (Wang et al. 1994b). Chez le riz, l'analyse phylogénétique montre que les deux systèmes sont représentés par les sous-familles AMT1 et AMT2 respectivement (Loque and Von Wiren 2004; Loque et al. 2007) (figure 11). Le riz comporte au moins douze gènes AMT (Bao-zhen et al. 2009).

Dans les sols, l'urée est rapidement dégradée en ammonium et en CO2 par des enzymes uréase. L'urée peut être absorbée par les racines et les feuilles. Les mécanismes qui régissent le transport de l'urée sont peu connus d'un point de vue moléculaire. Chez le riz, l'urée est absorbée grâce à un système de transport à haute affinité et basse affinité. Un transporteur à haute affinité (OsDUR3) a été caractérisé fonctionnellement (Wang et al. 2012).

2.2.2. Réduction du nitrate en ammonium.

Le nitrate doit nécessairement être réduit en ammonium pour être assimilé. Cette réduction est assurée par l'action successive de deux enzymes, la nitrate (NR) et la nitrite (NiR) réductase (Figure 11). Plusieurs facteurs peuvent entrer en jeu dans la régulation de ces enzymes, au niveau transcriptionel et post-transcriptionnel comme la concentration en nitrate, la lumière, certaines hormones végétales, la température…(Li et al. 2006).

Chez la tomate et le tabac, la concentration en azote peut avoir également un effet sur la régulation de l'enzyme nitrate réductase. En carence azotée, la quantité de protéine de la NR diminue très rapidement mais pas son niveau d'ARNm. En revanche, après un réapprovisionnement en azote, l'expression du gène de la NR augmente (Crawford et al. 1992). Ces résultats suggèrent que l'azote affecte l'expression de l'activité NR au niveau de la transcription ainsi qu'au niveau post-transcriptionnel.

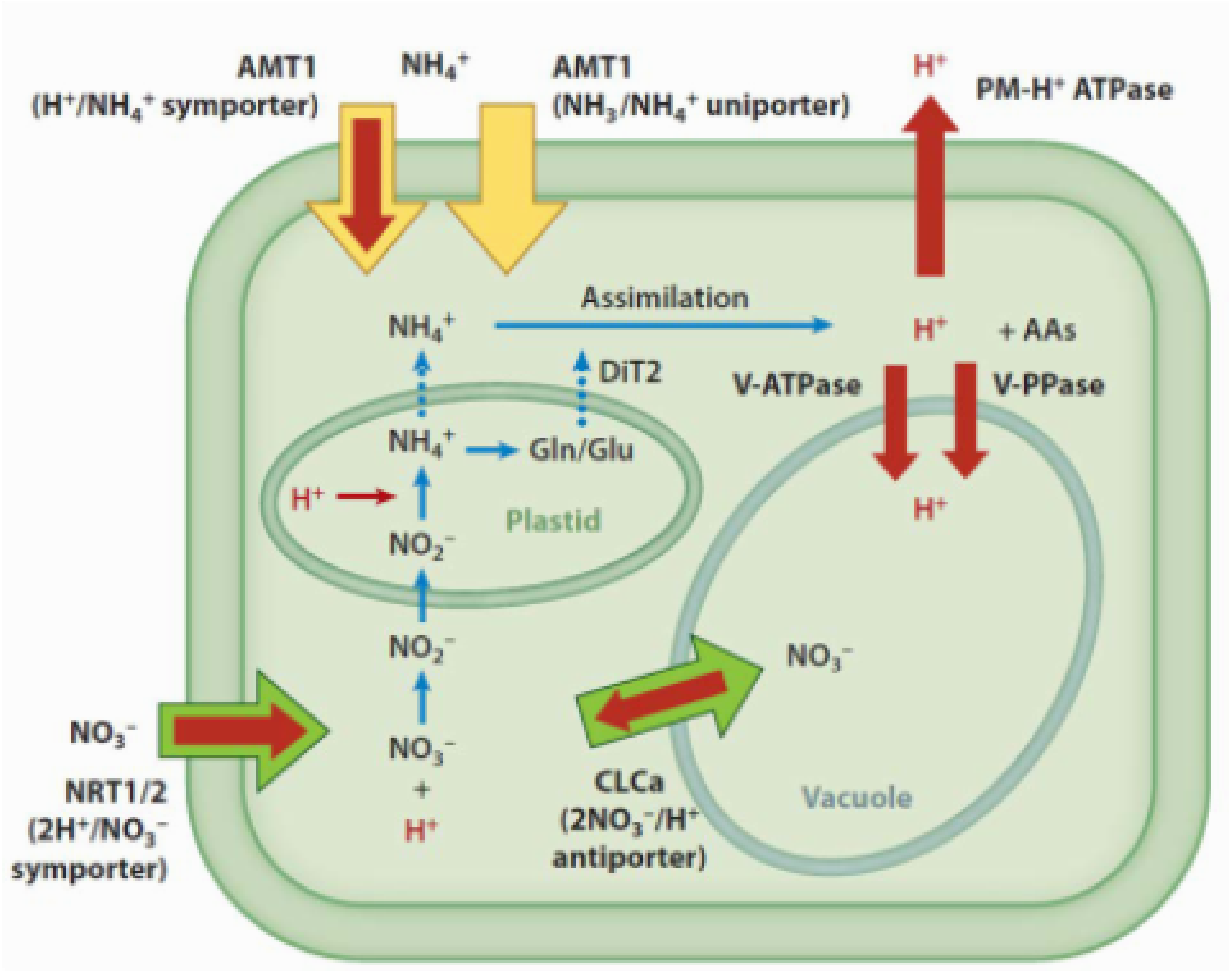


Figure 11: Relation entre l'absorption de l'ammonium et du nitrate (Xu et al. 2012)

2.2.3. Incorporation de l'ammonium dans les acides aminés.

L'ammonium, toxique pour la plante, doit être immédiatement réassimilé sous forme d'azote organique utilisable par la plante : la glutamine et le glutamate. Les deux enzymes glutamine synthétase (GS), glutamate synthase (GOGAT) sont les deux enzymes clefs de ce processus d'assimilation/réassimilation de l'azote dans la plante. L'ion ammonium est incorporé au glutamate par la GS pour former la glutamine. Le groupement amide de la glutamine est alors transféré à l'α-cétoglutarate par la GOGAT. Deux molécules de glutamate sont ainsi formées, l'une étant recyclée pour la formation de glutamine, l'autre utilisée pour la synthèse des acides aminés (Miflin B.J. 2002) (Figure 11).

Chez les plantes supérieures, il existe deux isoformes majeures de GS: GS cytosolique (GS1) et GS chloroplastique (GS2) (Miflin B.J. 2002; Harrison et al. 2000). Chez le riz il existe quatre gènes GS1 et un gène GS2 dont l'expression dans les feuilles et les racines varie en présence d'azote (Zhao and Shi 2006).

Fonction	Nom	N° Tigr
Glutamate deshydrogenase	OsGDH4	Os01g37760
Glutamate deshydrogenase	OsGDH3	Os02g43470
Glutamate deshydrogenase	OsGDH1	Os03g58040
Glutamate deshydrogenase	OsGDH2	Os04g45970
Glutamate synthase	NADH-GOGAT1 = OsGLT1	Os01g48960
Glutamate synthase	NADH-GOGAT2	Os05g48200
Glutamate synthase	Fd-GOGAT = Os GLU1	Os07g46460
Glutamine synthetase	GLN1-1 = OsGS1 cytosolic	Os02g50240
Glutamine synthetase	GLN1-3 cytosolic	Os02g50350
Glutamine synthetase	GLN1-2 = OsGS1-2 cytosolic	Os03g12290
Glutamine synthetase	GLN1-3 cytosolic	Os03g50490
Glutamine synthetase	GLN2 = OsGS2 chloplastic	Os04g56400
Nitrate reductase	NIA1	Os02g53130
Nitrate reductase	NIA2	Os08g36480
Nitrate reductase	NIA	Os08g36500
Nitrite reductase	NiR	Os01g25484
Nitrite reductase		Os02g52730
Nitrite reductase		Os05g42350

Tableau 4 : Les gènes du métabolisme de l'azote chez le riz.

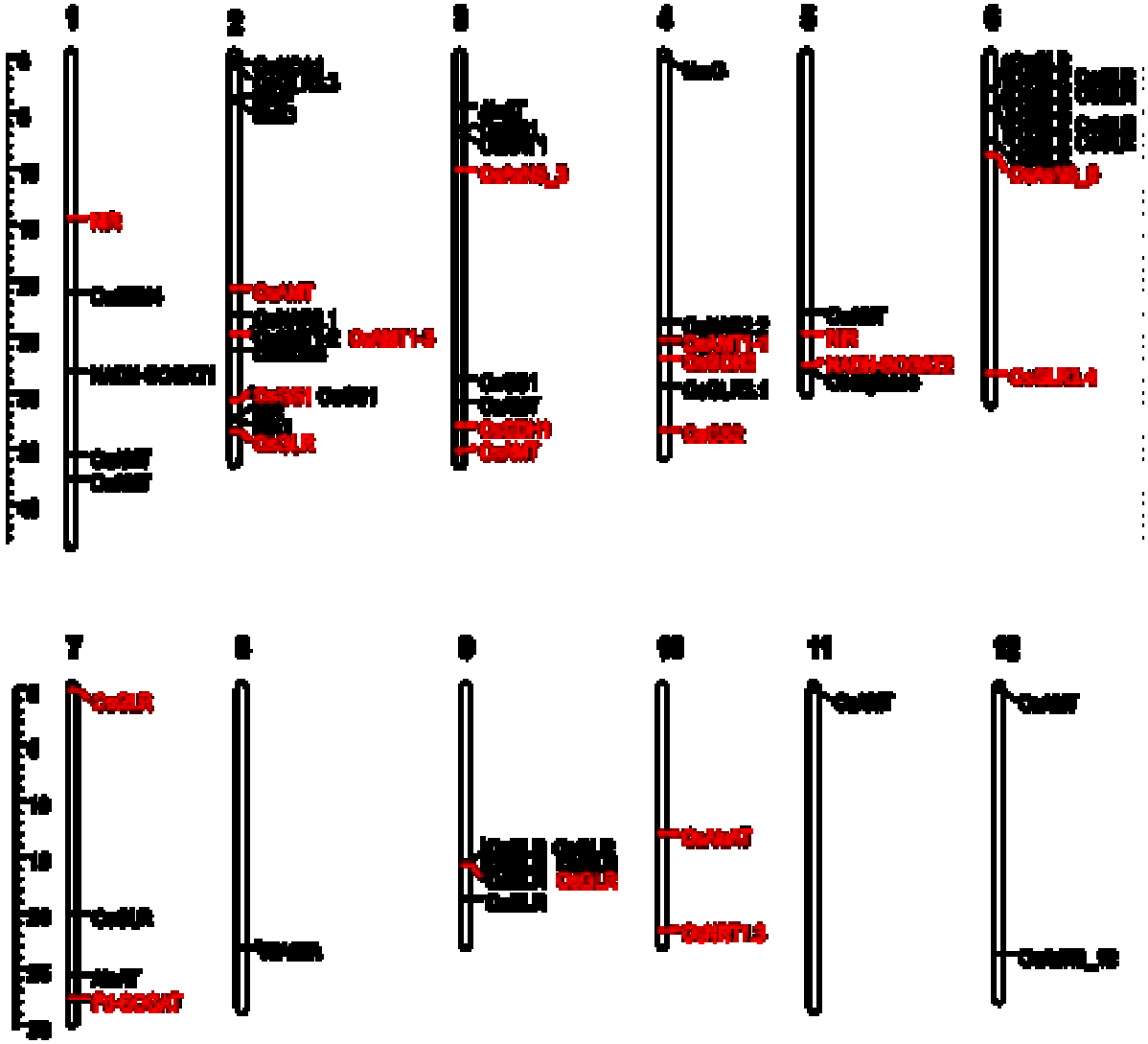


Figure 12: Position des principaux gènes impliqués dans le métabolisme azoté chez le riz. Les gènes qui sont différentiellement exprimés lors de l'interaction avec M. oryzae sont indiqués en rouge (annotation d'après Archipelago database).

AlaAT = Alanine Amino-transferase, AsNS = asparagine synthetase, GDH = Glutamate deshydrogenase, GLR = glutamate receptor, GOGAT = glutamate synthase, GS = glutamine synthetase, NIA = nitrate reductase, NOA = nitric oxide synthase, NiR = nitrite reductase, AMT = Transport Ammonium, NRT = Transport Nitrate, Ure = Urease.

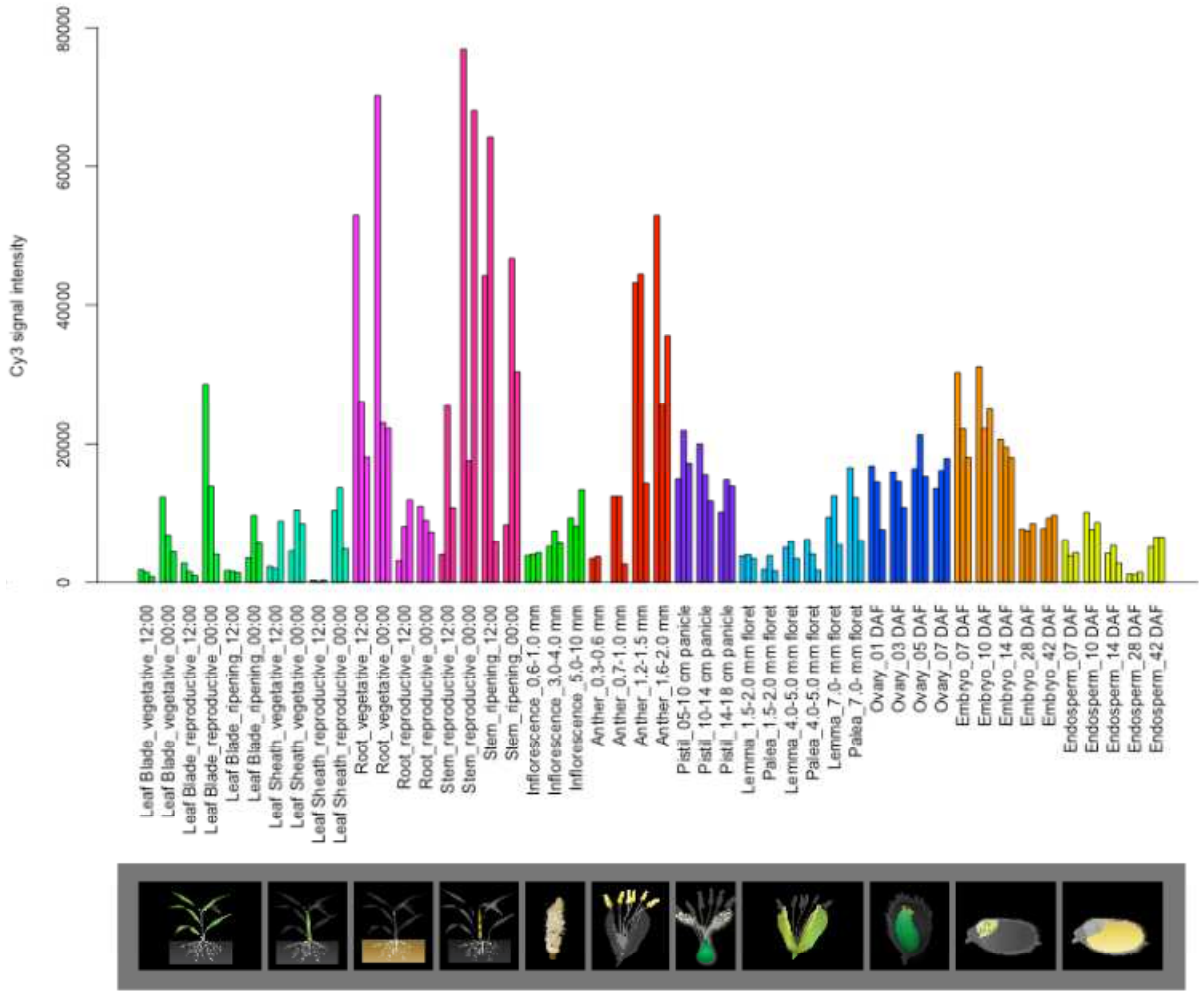


Figure 13: Expression du gène NADH-GOGAT1 dans les tissus de riz (données RiceXPro)

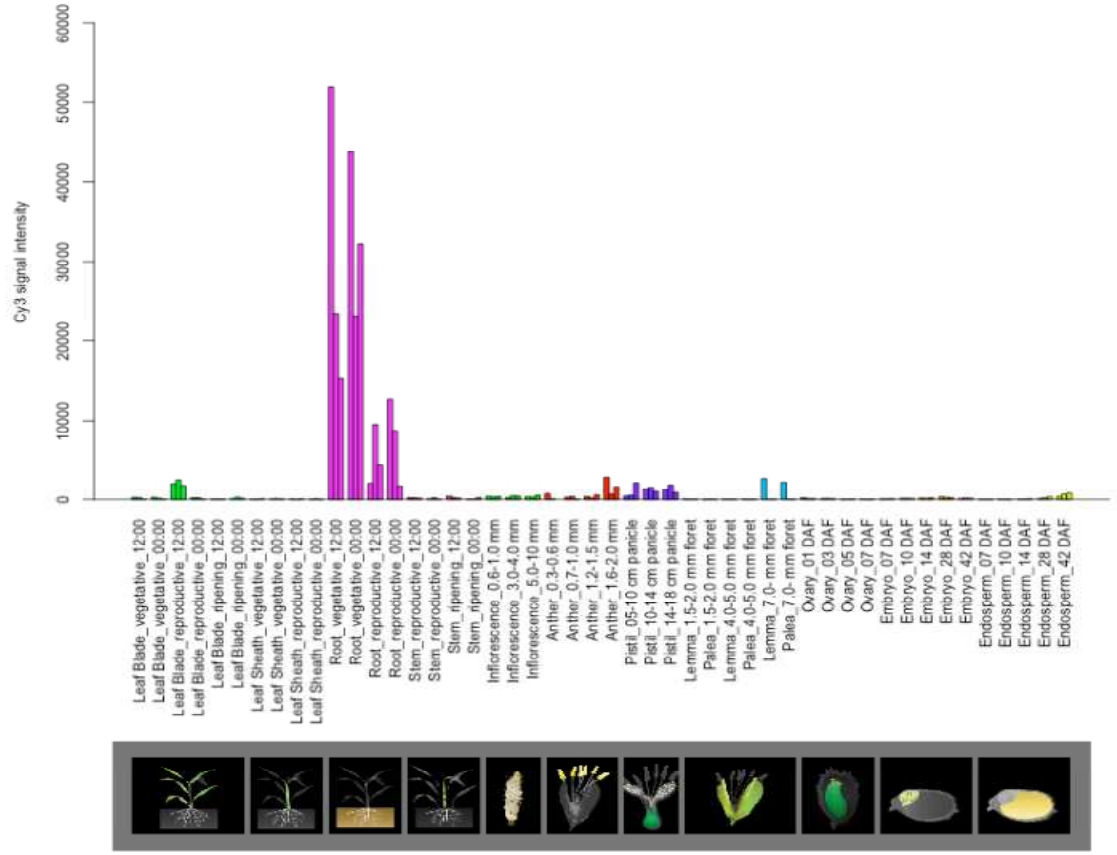


Figure 14: Expression du gène NADH-GOGAT2 dans les tissus de riz. (données RiceXPro)

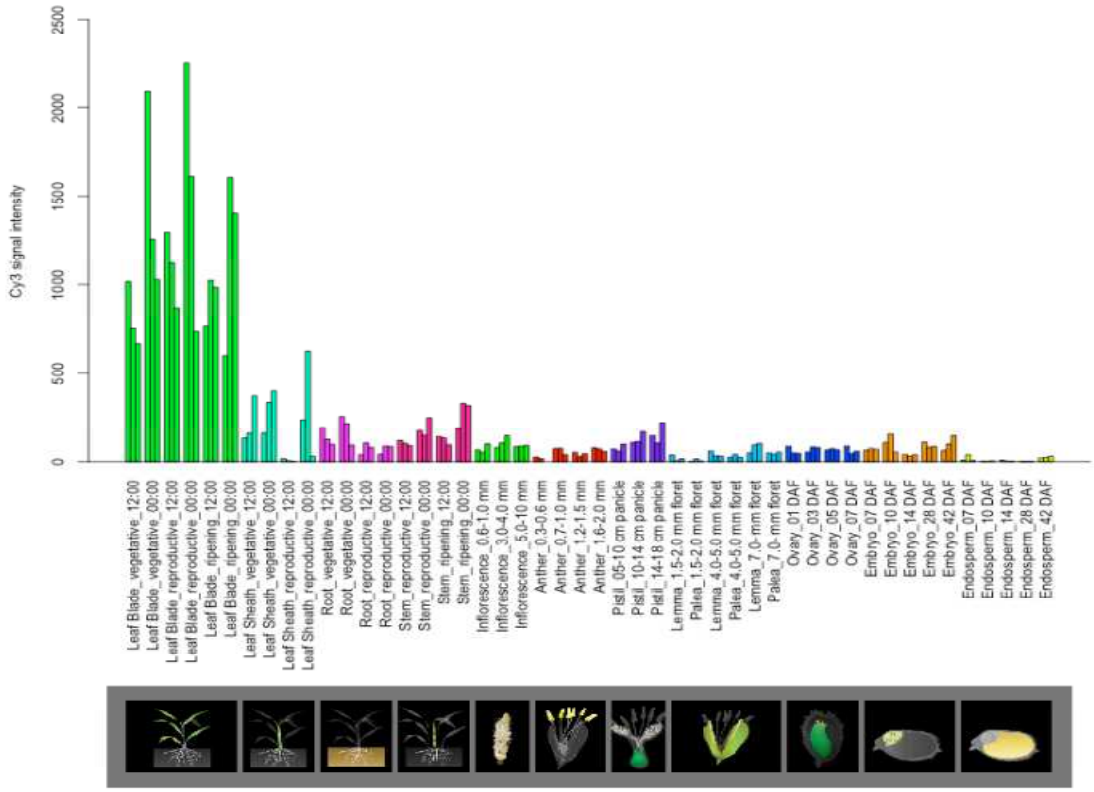


Figure 15: Expression du gène Fd-GOGAT dans les tissus de riz (données RiceXPro)

Deux types de glutamate synthase existent, qui se distinguent par le donneur d'électrons, ferrédoxine (Fd-GOGAT) ou NADH (NADH-GOGAT) (Zhao and Shi 2006; Hirel and Lea 2001). Chez le riz, deux gènes codent pour la NADH-GOGAT et un gène code pour la Fd-GOGAT. Chez le riz, NADH-GOGAT1 s'exprime dans de nombreux tissus, principalement les racines, la tige et l'anthère (voir Figure 13). L'expression de NADH-GOGAT1 dans les racines au stade végétatif de la plante est plus forte qu'au stade reproductif (d'après les données RiceXPro). Le gène NADH-GOGAT2 est principalement exprimé dans les racines aux deux stades végétatif et reproductif (voir Figure 14). Les protéines Fd-GOGAT s'expriment principalement dans les feuilles (voir figure 15). La Fd-GOGAT auraient surtout un rôle dans le chloroplaste au sein du métabolisme azoté photorespiratoire (Lea and Azevedo 2007), tandis que les deux NADH-GOGAT joueraient un rôle dans la croissance et le développement (Yamaya et al. 2002). Plusieurs lignées sur-expresseur de NADH-GOGAT ont montré une augmentation du poids des grains (80% au maximum), ce qui indique que cette enzyme est une étape clé pour la réutilisation de l'azote (Yamaya et al. 2002). Les mutants NADH-GOGAT1 présentent un développement très affecté et des modifications significatives de leur métabolisme azoté (Lu et al. 2011).

La glutamate déshydrogénase (GDH) est une famille d'enzymes catalysant une désamination réversible L-glutamate en 2-oxoglutarate ou l'a-cétoglutarate (a-KG), directement reliée au cycle de Krebs (Fisher 1985) et joue ainsi un rôle clef en fournissant un lien entre le carbone et le métabolisme azoté (Figure 16). Chez le riz quatre gènes codent pour des GDH.

Par ailleurs, deux autres enzymes: l'aspartate aminotransférase (ATT) et l'asparagine synthétase (ASN) sont importantes dans le processus d'incorporation de l'ammonium dans les acides aminés.

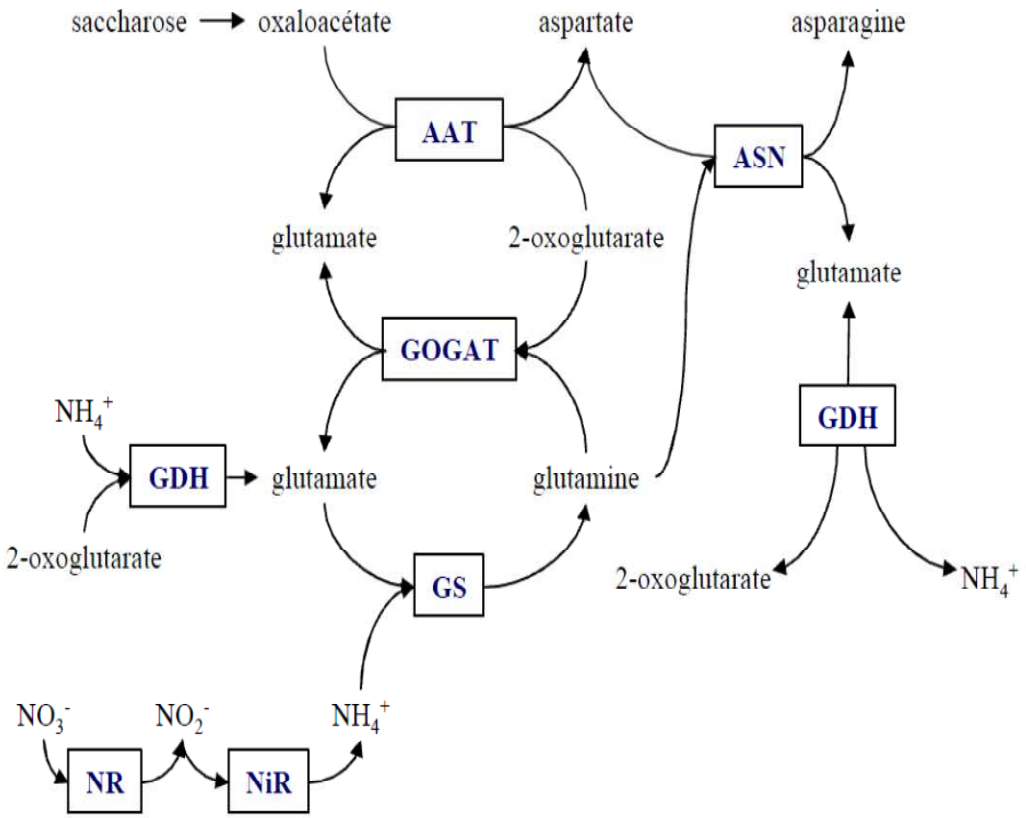


Figure 16: Voie de l'assimilation de l'azote (Coruzzi 2003).

GS : glutamine synthétase; GOGAT : glutamate synthase; AAT : aspartate aminotransferase; ASN : asparagine synthétase; GDH : glutamate deshydrogenase; NiR : nitrite réductase; NR : nitrate réductase.

Plusieurs gènes régulateurs du métabolisme azoté sont connus chez le riz (Tabuchi et al. 2007).

Un premier système de régulation pourrait impliquer des protéines kinases de type GCN2 (general control non-derepressible). Chez la levure, GCN2 régulent la synthèse des protéines au travers de la phosphorylation du facteur d'initiation de translation eIF2a en réponse à différent types de stress biotiques et abiotiques, notamment lors de carence en acides aminés. Chez arabidopsis, AtGCN2 est également impliqué dans la réponse à plusieurs stress différents dont des stress biotiques (Zhang et al. 2003).

Un deuxième système de régulation pourrait impliquer des gènes possédant un domaine ACT (amino acid-binding). Des gènes porteurs de ces domaines ont en effet été identifiés chez le riz et appelés OsACR (OsACR9, Kudo et al., 2007 ; OsACR7, Hayakawa et al.,2006 ; pour revue (Liu 2006)).

2.3. L'interaction entre la fertilisation azotée et la pyriculariose.

2.3.1. Généralités sur l'effet de l'azote dans les interactions plantes/ pathogènes

L'interaction entre les nutriments minéraux et les agents pathogènes des plantes est un facteur important qui influence la croissance et la production de cultures de plein champ. Les nutriments minéraux peuvent soit augmenter ou diminuer la résistance ou la tolérance de plantes aux agents pathogènes en effectuant des changements de croissance, de morphologie et de la composition chimique en particulier (Marschner 1995).

L'azote a été décrit comme étant un élément essentiel dans la relation de nutrition entre les plantes et les agents pathogènes (Tavernier et al. 2007). Cependant, l'effet de l'azote est très variable selon les cas. L'effet de l'azote pourrait dépendre du mode trophique de l'agent pathogène. Ainsi, les agents pathogènes biotrophes, par exemple Puccinia graminis et Erysiphe graminis, seraient favorisés par un apport élevé de fertilisation azotée. Par contre les agents pathogènes nécrotrophes, par exemple Alternaria, Fusarium et Xanthomonas spp., seraient défavorisés par un apport élevé de fertilisation azoté (Dordas 2008) (Tableau 5).

Pathogène ou malade		N bas	N haute	Références
Parasite obligatoire	Puccinia graminis	diminution	augmentation	Howard et al., 1994
	Erysiphe graminis	diminution	augmentation	Büschbel et al., 1992
	Oidium lycoparsiicum	diminution	augmentation	Hoffland et al., 2000
	Plasmodiophora brassicae	diminution	augmentation	Kiraly, 1976
	Tabacco masaic virus	diminution	augmentation	Singh, 1970
	Pseudomonas syringae	diminution	augmentation	Hoffland et al., 2000
Parasite facultative	Xathomonas vesicatoris	augmentation	diminution	Chase, 1989
	Alternaria solani	augmentation	diminution	Blachinski et al., 1996
	Furasium oxysporum	augmentation	diminution	Woltz and Engelhar, 1973

Tableau 5: Effet du niveau de fertilisation azotée sur la sévérité de quelques maladies (Dordas 2008).

Nom de maladie	Pathogène	Forme d'effet		
		Total N	NH4	NO3
Bacterial streak	Xanthomonas carnpestris pv. translucens	+		
Bacterial blight	Xanthomonas carnpestris pv. oryzae	-		
Leaf blight	Xanthomonas carnpestris pv. oryzae	+		
Bakanae disease	Gibberella fujikuroi	+		
Sheath rot	Acrocylindrium oryzae	+		
Brown leaf spot	Cercospora oryzae	+		
Scald	Gerlachia oryzae	-		
Brown spot	Bipolaris oryzae		-	+
Stem rot	Magnaporthe salvinii	+		
Blast	Pyricularia grisea		+	-
Sheath blight	Rhizoctonia solani	+		
Leaf scald	Rhynchosporium oryzae	+		
Sheath rot	Sarocladium oryzae		+	-
Leaf smut	Entyloma oryzae	+		
False smut	Ustilaginoidea virens	+		
White tip	Aphelenchoides oryzae	+		
Tungro	Rice tungro virus	-		

Tableau 6: Influence de l'azote sur le développement des maladies (Datnoff and 1994)

(+ : augmentation, - : diminution de la maladie)

Les données épidémiologiques sur la pyriculariose indiquent que la densité du couvert a un effet direct sur la sévérité des symptômes(Suzuki 1974) et l'azote, par la stimulation de la croissance, pourrait avoir un effet à ce niveau. Outre ces causes à l'échelle du couvert végétal, quatre hypothèses peuvent être formulées pour expliquer, à l'échelle du tissus, les effets de l'azote sur les maladies des plantes (Walters and Bingham 2007). Les nutriments peuvent avoir des effets sur :

La résistance physique de la plante (parois cellulaires)

La résistance biochimique (protéines de défense)

Le métabolisme général de la cellule (activité photosynthétique).

Le cycle infectieux du champignon

Première hypothèse : effet indirect dû à l'effet de l'azote sur l'architecture des tissus.

L'azote induit une augmentation du taux élongation des feuilles et du taux de croissance durant le stade végétatif. On peut également supposer un effet de l'azote sur la croissance cellulaire et sur la composition de la paroi végétale. Cependant cet effet est peu documenté (Macadam et al. 1989). Une quantité excessive d'azote par rapport au carbone dans la plante stimule la croissance par la création et par l'allongement de nouvelles feuilles qui ont alors des parois fines, ce qui les rendraient sensibles aux agressions (Talukder et al. 2005a).

Deuxième hypothèse : influence de l'azote sur la composition biochimique des cellules.

La fertilisation azotée modifierait la composition en acides aminés des cellules végétales et du coup la composition en différentes protéines dont les protéines de défense. Cette modification de la composition biochimique des cellules aurait un effet sur l'agent pathogène. Une augmentation significative de la concentration d'acides aminés dans l'apoplaste et sur la surface de la feuille, favoriserait la germination et la croissance des conidies de l'agent pathogène (Robinson and Hodges 1981). L'azote a un effet sur le métabolisme des plantes: baisse de l'activité de certaines enzymes clés de la synthèse des composés phénoliques comme la lignine qui est un composant de la paroi (Matsuyama and Dimond 1973). Tous ces éléments font partie du système de défense des plantes contre les infections. Les analyses de trasncriptome chez Arabidopsis sur des plantes subissant des stress azotés mettent en évidence une modification de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la paroi et l'expansion des cellules (Scheible et al. 2004).

Le métabolisme du glutamate dans les plantes (GM) joue un rôle essentiel dans l'interaction entre le métabolisme des acides aminés et la défense des plantes contre les pathogènes. Le changement du métabolisme du glutamate a affecté de la stratégie de défense de la plante de donner une réponse de résistance efficace. Ce fonction concernes le transport d'azote via le cycle de la glutamine synthétase et la glutamine-oxoglutarate aminotransférase (Seifi et al. 2013).

Par exemple, GS2 dans les feuilles infectées de tomate a été montré comme étant associé à la pathogénicité de P. syringae pv. Tomate (Perez-Garcia et al. 1995). Chez tournesol, une forte diminution de stockage glutamate dans les régions distales de non colonisés a été postulée comme une réaction défensive contre Botrytis cinerea (Dulermo et al. 2009).

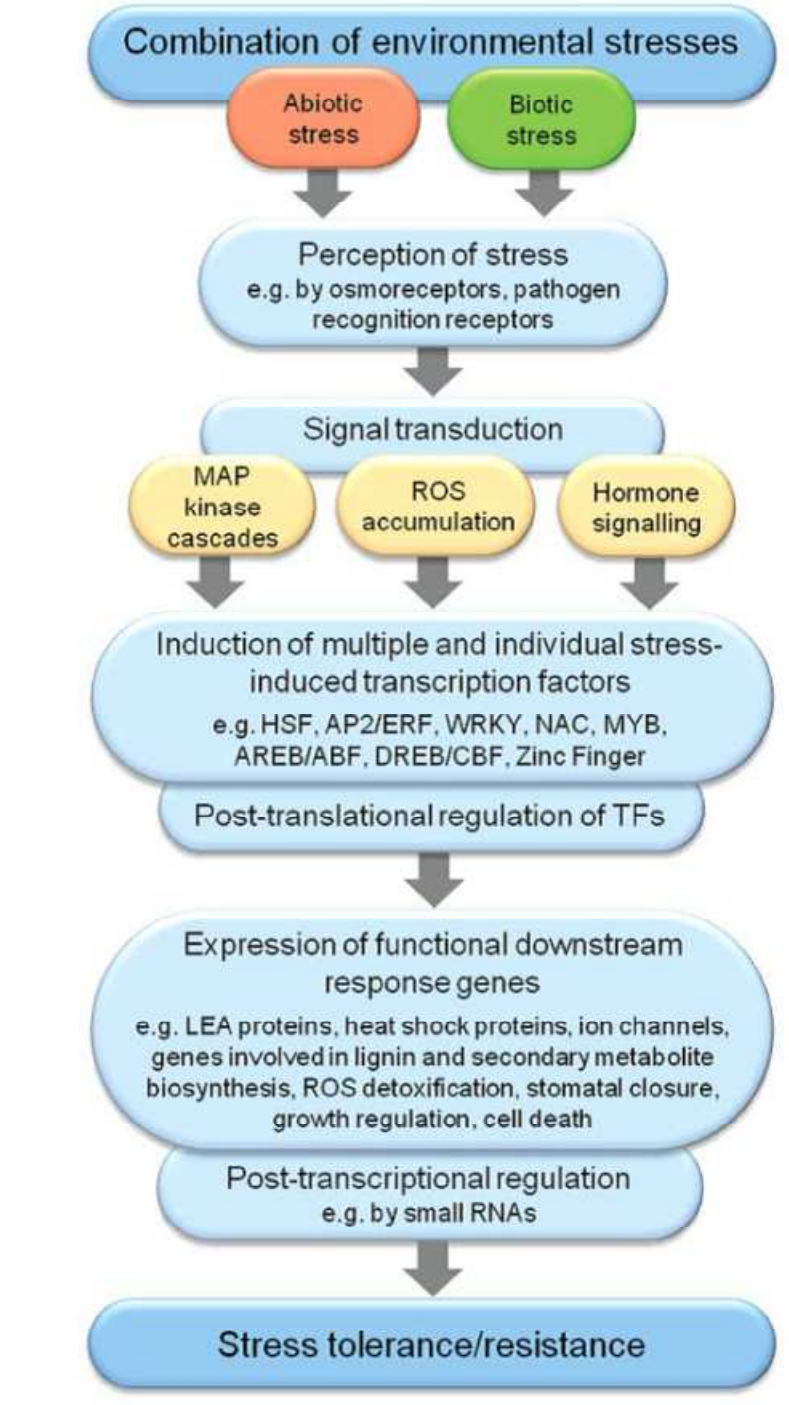


Figure 17: Les événements clés de la voie de transduction du signal activées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Atkinson and Urwin 2012).

Troisième hypothèse : régulation commune entre les voies du métabolisme azoté et le système de défense.

La réponse aux stress biotiques et abiotiques présente des voies communes et des régulateurs communs notamment via les hormones végétales (Atkinson and Urwin 2012) (figure 17).

L'étude de mutants impliqués dans le métabolisme azoté permet également de mettre en évidence un lien entre certains éléments du métabolisme azoté et la défense. Plusieurs gènes impliqués dans l'ubiquitination ont ainsi à la fois un rôle dans les défenses et le métabolisme azoté (Shirsekar et al. 2010). Les gènes ubiquitin ligases d'Arabidopsis ATL31 and ATL6 (ATL ; Arabidopsis Toxicos EN Levadura) sont induit par les MAMP, impliqués dans la sensibilité à Pseudomonas et leur expression est modifiée par le ratio carbone/azote (Maekawa et al. 2012b). De même, le gène BAH1/NLA, une Ubiquitin E3 Ligase, régule l'accumulation d'acide salicylique et la réponse à Pseudomonas chez Arabidopsis (Peng et al. 2007; Peng et al. 2008; Yaeno and Iba 2008). Deux orthologues de ce gène existent chez le riz.

Un autre lien possible entre le métabolisme azoté et le système de défense de la plante a été observé lors de l'étude des transporteurs de nitrate chez Arabidopsis. Le mutant nrt2.6 serait plus sensible à Erwinia amylovora (Dechorgnat et al. 2012b). Le mutant nrt2.1 présente une réponse modifiée à Pseudomonas, notamment au niveau des voies de SA, JA et ABA (Camanes et al. 2011; Camañes et al. 2012).

La reconnaissance par la plante de la présence d'un stress abiotique et/ou biotique active de nombreuses voies transductions du signal qui aboutissent à l'activation de milliers de gènes impliqués dans les réactions de tolérance/résistance stress. Ainsi des cascades de phosphorylation des MAP kinase s'activent pour mobiliser des facteurs de transcription et conduisent à la transcription des gènes impliqués dans le mécanisme de la résistance aux stress.

Le partage de régulateurs impliqués dans différentes voies pourrait expliquer les interférences entre stress biotiques et abiotiques

Quatrième hypothèse : modification du cycle infectieux du champignon

L'azote constitue une petite partie des composés de stockage de la spore des champignons et il pourrait être un facteur limitant la pénétration de la spore. Par exemple, une expression élevée d'un transporteur di/tri-peptide (ptr2) au stade de la pré-pénétration dans Stagonospora nodorum inhibe la pathogénicité (Solomon et al. 2004), ce qui suggère que l'azote est un élément principal à ce stade de la pénétration de ce champignon.

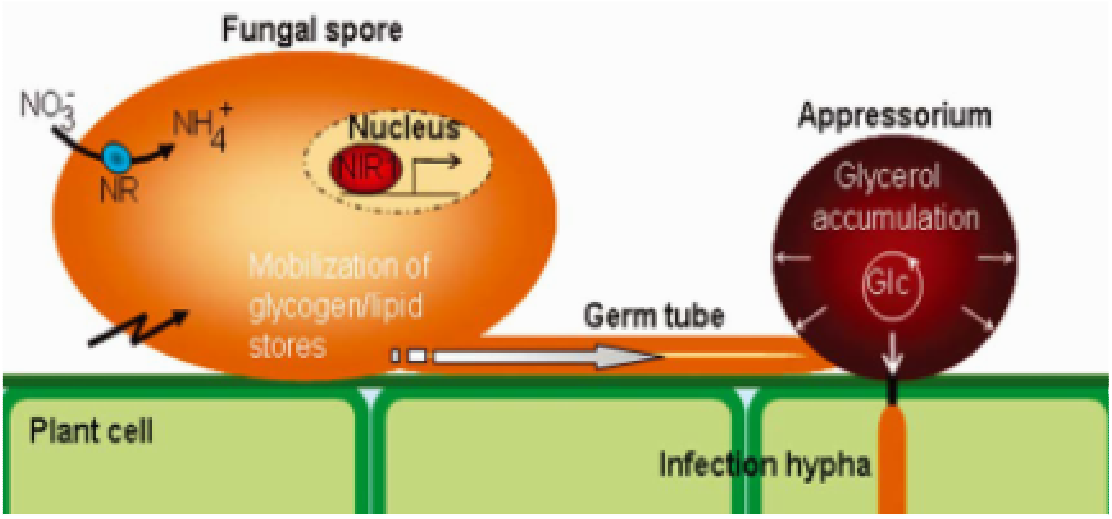


Figure 18: Relation entre l'azote et le processus de pénétration via l'appressorium (Divon et al. 2006).

D'autre part, une étude du transcriptome dans l'orge a révélé qu'un grands nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés sont exprimés pendant la germination des spores et la formation de l'appressorium du champignon Blumeria graminis f. sp. hordei (Thomas et al. 2001).

Nir1 est un gène nécessaire pour la transcription de la nitrate réductase (NR) chez Colletotrichum acutatum, mais est également impliqué dans d'autres processus liés à la formation de l'appressorium de ce champignon (Horowitz et al. 2006). Cela montre que l'azote est un facteur important dans la phase de pré-pénétration (Horowitz et al. 2006) (figure 18) .

Van den Ackerveden et al (1994) ont étudié l'induction de l'expression du gène Avr9 de Cladosporium fulvum in vitro dans des conditions d'azotes variables. Le résultat a montré qu'une augmentation de la quantité d'azote peut induire l'expression du gène d'avirulence Avr9.

2.3.2. L'effet de l'azote sur la pyriculariose

Dans le cas de la pyriculariose, une plus grande sensibilité des parcelles fertilisées a été observée au champ depuis longtemps et avait été baptisée « Koe-imochi » (Otani 1959; Tanaka 1961; Ou 1972; Bonman 1992). Par des expériences aux champs, en serre ou in vitro, les expérimentateurs ont pu mettre en évidence une influence des périodes de fertilisations, des formes d'azote et du génotype sur la sensibilité à la pyriculariose en présence de la fertilisation azoté.

2.3.2.1. La fertilisation azotée augmente la pyriculariose au champ

Un effet de la fertilisation azotée sur la pyriculariose a rapidement été observé au champs (Otani 1959; Amin and Venkatarao 1979; Kuerschner et al. 1992; Long et al. 2000b).

Toutes les études ne sont pas concordantes sur la description des symptômes observés, mais il semblerait qu'une augmentation du nombre de lésions ait systématiquement été observée (Otani 1959; Mukherjee et al. 2005b). Dans certains cas une augmentation de la taille des lésions et du type de lésions est également observé (Otani 1959; Matsuyama and Dimond 1973). Mukherjee (2005) a testé quatre génotypes « slow-blast » dans cinq niveaux d'azotes afin de déterminer l'effet de l'azote sur la progression de la pyriculariose. Le résultat a indiqué qu'il existe une augmentation significative du nombre de lésion (LN) et de l'aire sous la courbe de progression des maladies (AUDPC) en présence d'azote (tableau 7).

Une solution a été rapidement proposée via un fractionnement de l'apport azoté (Kuerschner et al. 1992; Otani 1959; Amin and Venkatarao 1979; Long et al. 2000b). Ainsi au champ, le riz serait moins sensible à la pyriculariose après une utilisation de 90 kg l'azote/ha amenés en deux fertilisations (1/3 à 30 jours après semis, 2/3 à 60 jours après semis) (Kuerschner et al. 1992) (figure 19). Cet apport fractionné permettrait de réduire une croissance végétative excessive en début de saison qui pourrait être un facteur favorable à la pyriculariose.

Des tests ont été effectués afin d'identifier pendant combien de temps l'apport azoté a un effet sensibilisant (Ishiguro et al., 1992). La sensibilité augmente tout de suite après l'application de la fertilisation et est à son maximum sept jours après puis diminue tout en restant à un niveau élevé. Ces résultats avaient déjà été mis en évidence lors d'expériences plus anciennes (Otani, 1959). Ainsi l'effet de la fertilisation azotée sur la pyriculariose est visible dès les premiers jours suivant la fertilisation. D'autre part, l'augmentation des symptômes d'azote serait corrélée à l'augmentation de la dose d'azote même si un plateau est généralement observé surtout car un apport excessif d'azote est nocif pour la plante (Otani, 1959 ; Mukherjer et al., 2005 ; Silva-lobo, 2012 ; Long, 2000).

Dans certaines études, les expérimentateurs ont fait varier la forme d'azote utilisée (nitrate ou ammonium) (Kronzucker et al., 1999a). Cependant, la nature de l'azote absorbé et sensibilisant le riz reste peu claire. Si les nitrates sont supposés être la forme d'absorption en riziculture pluviale, l'ammonium serait la forme absorbée en système irrigué. Cependant, les deux formes sont souvent délivrées en même temps. Il existe par ailleurs un antagonisme des voies ammonium et nitrate chez le riz (Kronzucker et al., 1999a; Kronzucker et al., 1999b). Notamment, les nitrates induisent les flux, l'accumulation et le métabolisme de l'ammonium. Au contraire l'ammonium réprime ces systèmes pour les nitrates (Kronzucker et al., 1999a; Kronzucker et al., 1999b). Dans le cas de la pyriculariose, une augmentation de la fertilisation sous forme d'ammonium ($NH4^+$) ou d'urée induit une augmentation significative de la sévérité (Otani, 1959). La prédominance d'une forme ou d'une autre est influencée par le fertilisant apporté, par le pH du sol mais aussi par divers pratiques culturales qui peuvent favoriser ou non la nitrification (défavorisée par la présence de résidus, et favorisée par le labour, entre autres) (Huber and Thompson, 2007; Fageria et al., 2011).

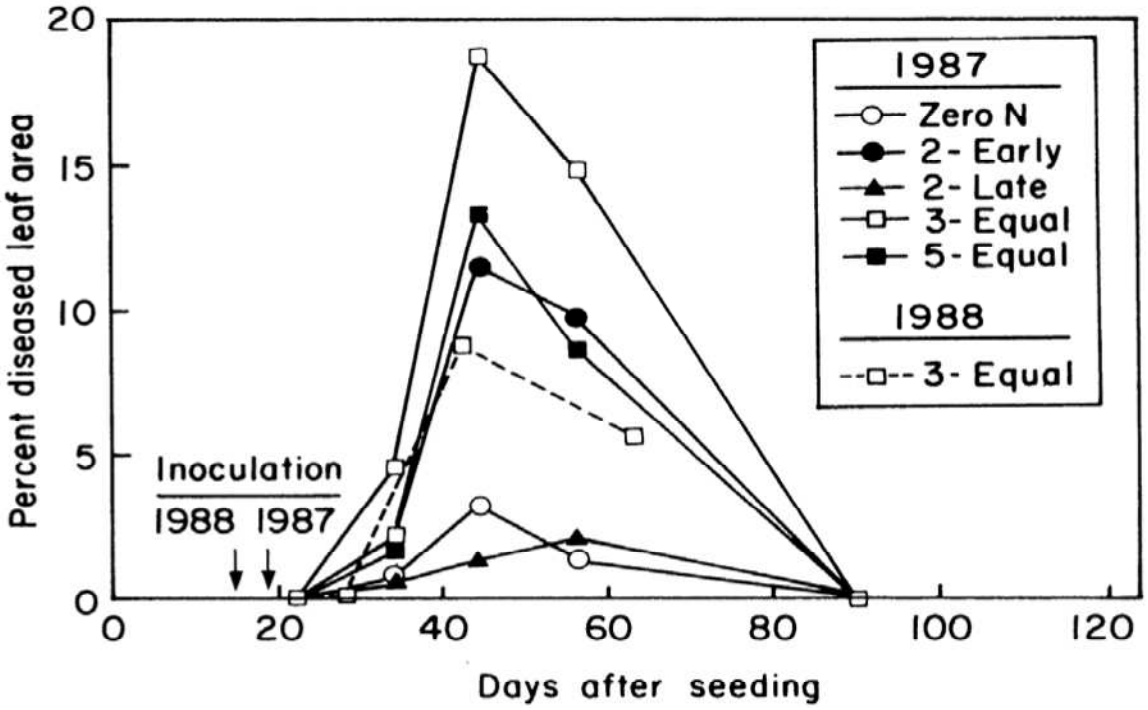


Figure 19: Effet du nombre et du temps de fertilisation sur la sensibilité du riz à Magnaporthe oryzae (Kuerschner et al. 1992). Zero N=sans fertilisation d'azote ; 2-Early=application 90kg N divisé en deux fertilisations 2/3 au semis et 1/3 à 30 jours après semis ; 2-Late=application 90kg N divisé en deux fertilisations 1/3 à 30 jours après semis et 2/3 à 60 jours après semis ; 3-Equal=application 90kg N divisé trois fertilisations 1/3 au semis, 1/3 à 30 et 60 jours après semis; 5-Equal=application 90 kg N divisé 5 fertilisations, 18kg au semis, à 15, 30, 45, 60 jours après semis.

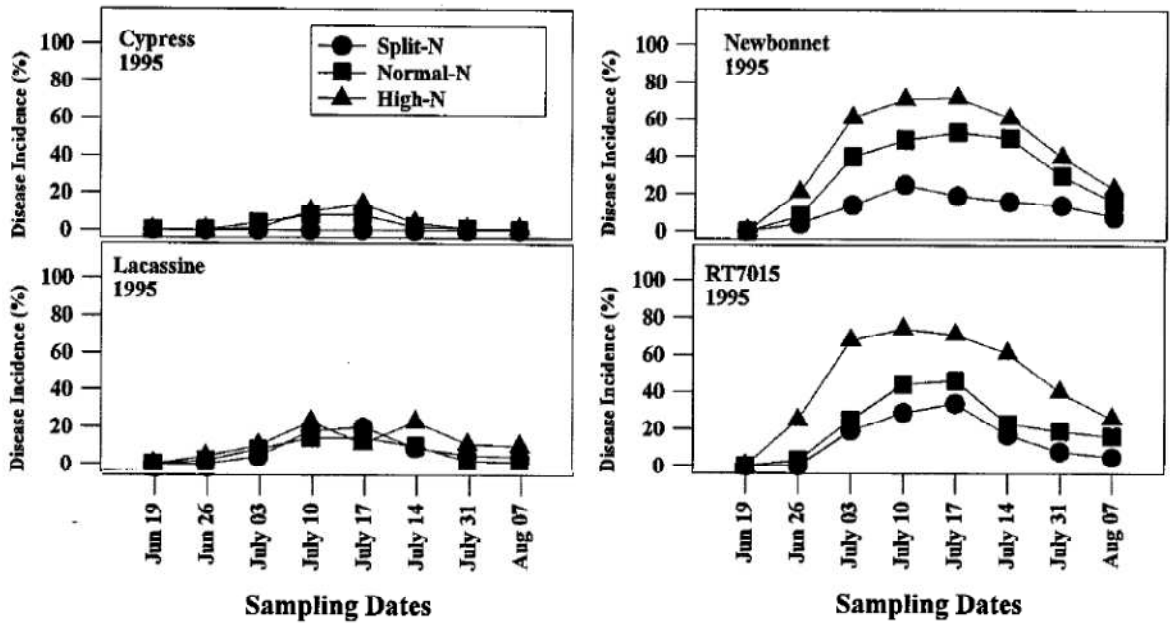


Figure 20: Effet de la quantité d'azote et des variétés sur la sensibilité du riz à la pyriculariose (Long et al. 2000b)

2.3.2.2. L'effet de l'azote sur la pyriculariose est différent selon les variétés de riz

Toutes les variétés de riz ne sont pas égales face à l'influence de l'azote sur la sévérité des symptômes de pyriculariose. Les variétés sensibles et très sensibles à la pyriculariose sont particulièrement affectées par la présence d'azote (Long et al. 2000b; Mukherjee et al. 2005b) (Figure 20).

Puisque des différences quantitatives sont observables entre les variétés de riz, ce phénotype peut donc être utilisé pour des cartographies QTL. Une recherche de QTLs de résistance à M. oryzae a été faite dans des conditions azotées différentes en utilisant 100 lignés HD (Haploide Doublée) issues du croisement Bala x Azucena (Talukder et al. 2005a). Ces lignés de riz ont été cultivées avec deux traitements d'azote différents. Les deux tiers des plantes sont sensibles à la pyriculariose en condition de haut niveau de fertilisation azotée. Ce travail a permis de mettre en évidence un QTL sur le chromosome 12 lié à la fois à une résistance élevée sous fort apport d'azote (Talukder et al. 2005a).

2.3.2.3. Quelles pistes déjà explorées pour expliquer l'effet de la fertilisation azotée sur la pyriculariose ?

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette interaction entre le métabolisme azoté et l'intensité des symptômes observés.

La fertilisation azotée pourrait avoir un effet sur l'architecture du couvert et donc indirectement sur l'épidémiologie de la pyriculariose. Il a montré que l'azote a un effet sur la sensibilité à la pyriculariose via un rôle d'augmentation du tallage et de la densité de la canopée (Kuerschner et al. 1992).

La fertilisation azotée pourrait avoir un effet sur la structure des cellules végétales. Notamment la composition de la paroi pourrait être modifiée ce qui aurait une influence sur la capacité du champignon à pénétrer dans les cellules. Une diminution de la quantité d'hémicellulose et de lignine dans le riz en présence d'azote a également été observée, ce qui pourrait provoquer une résistance mécanique plus faible (Matsuyama 1975). L'application d'azote diminuerait le pourcentage en silice de la paroi de certaines de cellules de l'épiderme (Otani 1959). Or la silice est un composé important pour la résistance du riz à la pyriculariose et agit comme une barrière physique pour empêcher la pénétration du champignon. La silice peut former des complexes avec des composés organiques dans les parois cellulaires, ce qui pourrait augmenter leur résistance à la dégradation par les enzymes de M. oryzae (Volk et al. 1958). En plus, la silice peut être associé à la lignine dans la paroi de la cellulaire du riz pour inhiber le développement de la pyriculariose (Inanaga 1995).

La fertilisation azotée pourrait avoir un effet sur le système de défense du riz. L'activité de la PAL diminue de 32% en présence d'azote et l'activité de la tyrosine amonialyase de 23% (Matsuyama and Dimond 1973). Treize des 30 gènes fonctionnellement identifiés comme induits en carence azotée sont aussi, d'après la base de donnée ARCHIPELAGO (Vergne et al. 2008), différentiellement exprimés au cours de l'infection par M. oryzae.

La fertilisation azotée pourrait avoir un effet sur le métabolisme de la cellule et donc indirectement sur le champignon. Ainsi plusieurs études ont mesuré la teneur en azote des cellules végétales. Une corrélation entre la teneur en azote et la sévérité de la maladie a ainsi été mise en évidence (Talukder et al. 2005a; Filippi and Prabhu 1998; Silva-Lobo et al. 2012). Dans certain cas, cette corrélation a même pu être mise en évidence indirectement via la mesure de la teneur en chlorophylle par des capteurs de type SPAD (Silva-Lobo et al. 2012). En effet, il existe une corrélation positive entre le taux d'azote et le contenu de chlorophylle dans la feuille panicule. Et il a montré également qu'une relation entre la maladie de la panicule et le contenu de chlorophylle était linéaire et positive (Silva-Lobo et al. 2012). La composition en acide aminés est modifiée mais la corrélation serait moins évidente qu'avec la teneur en l'azote total (Otani 1959). Dans cette étude, Otani a mesuré les acides aminés sous différentes conditions de fertilisation azotée. Le résultat a montré que certains acides aminés (Alanine, Leucine ; acide aspartique) sont moins présents dans le riz en condition de faible apport d'azote (tableau 8).

Variable	Leaf blast	
	1987	1988
Tillers (per m2)	0.93	0.38
Canopy height (cm)	0.67	0.19
Canopy cover (%)	0.8	0.05
Total dry matter (kg/ha)	0.62	0.66
N (%)	0.54	0.56
Si (%)	0.72	0.55
N (kg/ha)	0.64	0.73

Tableau 7: Coefficients de corrélation (r) entre la sévérité de pyriculariose sur feuille et différents paramètres (Kuerschner et al. 1992).

Niveau d'azote	acide aspartique	glutamine	asparagine	glycine	alanine	leucine	arginine
azote standard	-	+	+	+	-	-	+
double d'azote	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 8: Acides aminés dans le riz dans différentes conditions d'apport azoté (Otani 1959).

Les études de transcriptomiques sur le riz en condition de stress azoté permettent de donner une idée des modifications qu'engendrent la répression ou l'induction de certaines familles de gènes (Cai et al. 2012b; Konishi et al. 2001b; Lian et al. 2006). Il en ressort tout d'abord que les gènes du métabolisme azoté sont induits en présence d'une fertilisation plus riche en NO3- (Cao et al. 2008). Un autre résultat important qui a été observé est que les gènes de réponse aux stress biotiques et abiotiques seraient plus fortement exprimés en cas de carence en azote (Talukder et al. 2005a; Li et al. 2006).

La prolifération rapide d'hyphe de M. oryzae dans les tissus végétaux après 3 jours est associée à une acquisition et à une utilisation des éléments nutritifs accélérés par l'agent pathogène. La conversion des photoassimilats en mannitol et en glycérol semble stimuler la croissance des hyphes. (Parker et al. 2009). De plus l'azote a été décrit comme ayant une influence sur plusieurs gènes de pathogénicité de Magnaporthe oryzae. Par exemple, le gène TPS1 contrôle l'expression du gène répresseur du métabolite d'azote (NMR1) et est nécessaire pour l'expression des gènes associés à la virulence (Wilson et al. 2007). Le gène MPG1 est un gène de pathogénicité Magnaporthe oryzae qui régule aussi l'accès au nutriment de M. oryzae. (Lau and Hamer 1996).

PROJET DE THESE

Les outils disponibles dans le modèle Oryza sativa - Magnaporthe oryzae permettent d'approfondir les mécanismes d'interaction entre systèmes de culture et expression de la résistance (Wilson and Talbot 2009). En effet, le riz est l'espèce d'intérêt agronomique pour laquelle les connaissances et les outils ont été les plus développés et Magnaporthe oryzae est le premier champignon phytopathogène dont le génome a été séquencé (Dean et al. 2012). Des ressources génétiques très importantes sont disponibles et la génétique du champignon, y compris la transformation et le remplacement de gènes, sont maîtrisés. De plus, les données sur la génétique de la résistance du riz à la pyriculariose sont très documentées (Ballini et al. 2008a). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la sensibilité du riz à la pyriculariose est augmentée en condition de haut niveau de fertilisation azotée (Talukder et al. 2005a). Cependant, on ignore encore les raisons pour lesquelles l'azote a une influence sur le niveau de résistance du riz. Peu d'études ont exploré l'interaction entre le métabolisme azoté et les voies de défense au niveau moléculaire ou génétique. Pourtant il semble qu'il existe des zones du génome qui impliqueraient une interaction entre le métabolisme azoté et la résistance du riz à Magnaporthe oryzae. Ce projet se propose d'utiliser l'interaction modèle riz/Magnaporthe oryzae afin de mieux comprendre à terme les effets d'une pratique culturale (la fertilisation azotée) sur la résistance du riz à Magnaporthe oryzae.

Par commodité de langage, le phénomène observé au laboratoire a été dénommé la NIS (pour « Nitrogen-Induced Susceptibility »). Les objectifs principaux de la thèse étaient de :

1- mettre au point un système simplifié permettant d'étudier au laboratoire l'augmentation de la sensibilité induite par l'apport azoté.

2- analyser les effets de l'azote sur la croissance de M. oryzae et son pouvoir pathogène

3- analyser les effets de l'azote sur le déploiement des défenses connues du riz

4- explorer les effets de l'azote au travers de la diversité du riz et des différents types de résistance (complètes et partielles)

5- identifier par cartographie des zones du génome du riz importantes pour la NIS.

Les résultats sont présentés sous forme de deux articles qui ont été soumis simultanément à la revue RICE.

PREMIERE PARTIE : Mise en place de la méthodologie et étude cytologique et moléculaire de l'interaction entre l'azote et la sensibilité à la pyriculariose du riz.

1. Introduction

L'une des conséquences de la révolution verte, qui a permis d'augmenter les rendements, a été une utilisation massive d'engrais azotés. L'azote est un élément nutritif essentiel tant pour les plantes que pour leurs agents pathogènes (Tavernier et al. 2007). Cependant, il est couramment observé qu'en condition de haut niveau de fertilisation azotée, les parasites obligatoires (biotrophes) seraient favorisés et les symptômes de la maladie seraient par conséquent plus intenses (Dordas 2008). Au contraire, les parasites facultatifs (nécrotrophes) seraient favorisés en condition de bas niveau de fertilisation azotée (Dordas 2008).

Cet effet de la fertilisation azotée a également été observé dans le cadre de l'interaction entre le riz et Magnaporthe oryzae. Plusieurs études ont été réalisées afin d'analyser les symptômes de la pyriculariose aux champs en faisant varier les différentes les quantités d'azote. La plupart des études ont montré que la sensibilité du riz à la pyriculariose est plus importante en condition de haut niveau de fertilisation azotée (Talukder et al. 2005a; Long et al. 2000b; Matsuyama and Dimond 1973).

Cependant, l'effet de l'azote sur la croissance du champignon et l'expression des gènes du champignon n'a pas été beaucoup étudié. Dans le travail présenté dans cet article, nous avons confirmé l'effet de la fertilisation azotée (quantité, période de fertilisation) sur la pyriculariose. En plus, nous avons également examiné la croissance du champignon avant et après la pénétration pour suivre le développement du champignon dans les cellules en présente d'azote. En mesurant la croissance des plantes, la teneur en azote total des plantes et l'expression de gènes fongiques, nous avons essayé de mieux comprendre les effets de l'apport azoté sur l'expression de la résistance des plantes à la pyriculariose du riz.

Dans cet article, nous montrons que, en condition contrôlée, la maladie augmente lorsque l'apport azoté est élevé et la fertilisation est faite un jour avant inoculation. En plus, nous avons constaté que la croissance du champignon est affectée avant et après la pénétration dans la plante, mais que le taux de pénétration final n'est pas affecté ; un changement du taux de pénétration n'est donc pas responsable de l'augmentation de sensibilité. Après la pénétration du champignon, en présence d'azote, on observe de légers changements dans la croissance des plantes, mais pas de modifications d'expression des gènes de défense. D'autre part, le champignon semble croître mieux dans l'environnement riche en azote induit par le traitement. Cependant, l'expression de quelques gènes régulateurs de la pathogénicité connus est réduite sous le régime riche en azote. Ces gènes étant connus pour être induits par la carence azotée in vitro, cela suggère qu'après apport d'azote à la plante, le champignon ne se trouve plus en carence azotée. Cette hypothèse est renforcée par l'observation qu'un apport en certains acides aminés un jour après inoculation permet déclenche la NIS.

2. Article 1*: *Nitrogen fertilization increases disease severity to rice blast fungus by affecting fungal pathogenicity but does not dampen plant defense

Nitrogen fertilization increases disease severity to rice blast fungus by affecting fungal pathogenicity but does not dampen plant defense

Thuy Thi Thu NGUYEN [1*], Elsa BALLINI[1*], Huichuan HUANG[2], Xiahong HE[2], Jean-Loup NOTTÉGHEM[1] and Jean-Benoit MOREL[3]

*: contributed equally to this work

[1]SupAgro, UMR BGPI INRA/CIRAD/SupAgro, Campus International de Baillarguet, TA A 54/K, 34398 Montpellier, France

[2] College of Plant Protection, Yunnan Agriculture University, Jinhei Road, Panlong District, Kunming, Yunnan, China

[3]INRA, UMR BGPI INRA/CIRAD/SupAgro, Campus International de Baillarguet, TA A 54/K, 34398 Montpellier, France

Corresponding author:

jbmorel@cirad.fr, Phone +33499624838, Fax +33499624822

INRA, UMR BGPI INRA/CIRAD/SupAgro, Campus International de Baillarguet, TA A 54/K, 34398 Montpellier, France

Subject area:

Environmental and stress responses, regulation of gene expression

ABSTRACT

Nitrogen-Induced Susceptibility (NIS) to plant diseases is a widespread phenomenon. In the case of rice blast disease, despite its agronomical importance, the molecular and cellular events underlying this phenomenon called “Koe-Imochi” are poorly understood. In this work, we set an experimental system in which nitrogen supply strongly affects rice blast susceptibility whereas it is only slightly perturbing plant growth. We show that fungal growth is affected before and after penetration in the plant but that the final penetration rate is not affected; thus a change in penetration is not responsible for increased susceptibility. In contrast, increased fungal growth late during infection of the plant is associated with enhanced lesion number and size. Differences in total nitrogen amount and defense gene expression before infection are unlikely to be responsible for the observed increase in penetration. After penetration, small changes in plant growth, but not modifications of the transcriptional regulation of defense genes, could be responsible for nitrogen-induced susceptibility. On the other hand, the fungus seems to perceive small differences in nitrogen amount after penetration and this may explain enhanced growth under high nitrogen regime. Indeed, exogenous treatment with some free amino acids after inoculation mimicked Nitrogen-Induced Susceptibility, further arguing that this phenomenon is mostly due to a trophic relation between the plant and the fungus. This experimental system also revealed that nitrogen-induced susceptibility to rice blast is dependent on the plant genetic background.

Keywords: Defense, fertilizer, Magnaporthe, nitrogen, pathogenicity, rice.

INTRODUCTION

Nitrogen fertilizers brought by the Green Revolution drastically increased yield but are also known to have increased the impact of many plant diseases (Dordas 2008). The interaction between the blast fungus Magnaporthe oryzae and rice is no exception. Very early, nitrogen fertilizers have been associated with an increase of blast disease in the field, a phenomenon called « Koe-imochi » (Ou 1972; Tanaka 1961; Bonman 1992; Otani 1959). Given the economical impact of this disease (Ribot et al. 2008) as well as the fact that this interaction is a model for the analysis of cereal/fungal interactions, understanding the mechanisms by which nitrogen is inducing blast susceptibility is of major importance.

« Koe-imochi », that is nitrogen-induced susceptibility of leaf blast, is characterized by an increase in lesion number (Mukherjee et al. 2005a; Otani 1959; Talukder et al. 2005b) and in a limited number of cases it is also associated with a change in the type of lesions (Matsuyama and Dimond 1973; Otani 1959). The number of lesions increases up to 2-fold and the size of lesions can be increased by 3.8-fold (Otani 1959). However, there has been no analysis at the cytological level of the events associated with this increase in lesion number and size. In particular, the frequency of penetration of the fungus, which could impact on lesion number, has not been established under high nitrogen. In other systems (for review see (Robinson 1980)), it has been observed that germination and growth of the fungus on the plant surface was increased by high nitrogen levels. This suggested that a trophic relationship, already taking place at the leaf surface, could be responsible for the enhancement of susceptibility under high nitrogen regime.

The mechanisms of nitrogen-induced susceptibility are far from being understood. In the field, there are several reasons that explain this phenomenon; for instance, tillering is increased by high nitrogen levels and as a consequence, the density of the canopy becomes more favorable to disease dispersion (Kuerschner et al. 1992). However, several other reasons at the level of the plant have been proposed.

First, fungal pathogenicity could be affected by nitrogen metabolism. Indeed, the expression in vitro of several regulators of pathogenicity was shown to be induced by nitrogen starvation. For instance, the hydrophobin MPG1 gene encoding a positive regulator of pathogenicity was induced in vitro by nitrogen starvation (Donofrio et al. 2006) is induced. Likewise, the transcription of several regulators of pathogenicity (like MPG1) is under the control of regulators of nitrogen utilization (NPR1 and NPR2 (Lau and Hamer 1996)).

Moreover, it was shown that nitrogen starvation induced the expression of a large number of genes also found to be expressed during growth of the fungus in plant tissue, like the T4H gene (Talbot et al. 1997; Donofrio et al. 2006; Mathioni et al. 2011; Wang et al. 2011). Thus nitrogen starvation in vitro enhances the expression of pathogenicity factors. It is not established whether in planta nitrogen starvation does induce the expression of pathogenicity factors. Nevertheless, the observation that pathogenicity genes are induced in vitro by nitrogen starvation suggested that a nitrogen-poor environment exists during colonization (Bolton and Thomma 2008; Wilson et al. 2012; Bolton 2009). This is somehow a paradox with respect to the observation that high nitrogen regimes increase rice blast susceptibility. Thus the nitrogen status of infected tissues and its effects on the expression of pathogenicity genes of M. oryzae is still a matter of debate (Solomon et al. 2003).

The second hypothesis postulates a trophic relationship to explain the increased fungal growth under nitrogen levels. When total nitrogen was measured in parallel to rice blast symptoms, Otani (1959) found at best an increase of 22% between low and high nitrogen regimes. More recently, an increase of up to 78% total nitrogen was found by Talukder et al (2005b). For many pathogens, a significant increase in amino-acid content in the apoplasm and on the leaf surface may increase hyphal growth (Robinson 1980). This is exemplified by the observation that fungal growth is increased in vitro in the presence of high concentrations of nitrogen sources (Otani 1959). Moreover M. oryzae could be able to modulate nitrogen metabolism very early during the first phases of invasion (before 2 dpi) (Fernandez and Wilson 2012; Parker et al. 2009). However, there is no evidence in the case of M. oryzae that fungal growth in planta is increased by higher nitrogen availability.

Third, high nitrogen regime significantly impacts on plant growth (Makino et al, 2011) which in turn is critical for blast disease symptoms (Ribot et al. 2008; Vergne et al. 2010). It is noteworthy that studying the effects of nitrogen supply on blast disease is very much constrained by its major effects on plant development. This poses the almost unsolvable problem to distinguish between the direct and indirect effects of nitrogen supply on disease resistance. In most of Otani's pioneer work (1959), significant effects on plants growth were associated with high nitrogen supply and an increase of blast symptoms. For instance, tillering was often significantly different between high and low nitrogen inputs. One way of circumventing this problem is to shift in time the sowing of the plants that will be supplied with high nitrogen in such a way that at the time of inoculation, plants have the same apparent developmental stage than plants supplied with less nitrogen fertilizer (Talukder et al. 2005b).

However in this case, the supply of nitrogen is done on plants that do not have the same developmental stage and this may also impact on the outcome of the experiment. Thus, it is hard to eliminate the possibility that nitrogen impacts on plant disease through its effects on plant development.

Molecular interactions between the nitrogen metabolism and disease resistance pathways could be a fourth explanation for the enhancement of disease by nitrogen supply. It is now clear that these two pathways are intimately connected. For instance, several Arabidopsis plant mutants affected in the regulation of nitrogen metabolism have also been shown to be impaired for pathogen resistance (Camañes et al. 2012; Dechorgnat et al. 2012a; Maekawa et al. 2012a). However, there are only very limited reports on the effects of nitrogen supply onto genes or pathways known to be required for disease resistance. A reduction in the range of 30% of the silification of the epidermal cells of rice has been demonstrated under high nitrogen regime (Otani 1959). This may increase penetration of the rice blast fungus as silicon is known to constitute a physical barrier against this fungus (Hayasaka et al. 2008). Similarly, lignin content is strongly reduced by more than 50% under high nitrogen, in parallel to a 30% decrease in the Phenyl-ammonia Lyase (PAL) activity (Matsuyama and Dimond 1973). This may have positive effects on pathogen growth as lignins are known to be required for disease resistance (Kawasaki et al. 2006). There is no report in rice on the effects of nitrogen supply on defense gene expression. The only available reports are dealing with the effects of nitrogen starvation in the absence of infection. In this case, it is noteworthy that nitrogen starvation induces in roots (Lian et al. 2006) and in leaves (Cai et al. 2012a) genes that are also markers of disease resistance. One could extrapolate that high nitrogen input would decrease the expression of such genes.

In this work, we set up an experimental system triggering Nitrogen-Induced blast Susceptibility in rice, a phenomenon that we call NIS. The growth of the fungus was examined before and after penetration to get more insight on the cellular events taking place. By measuring plant growth, total nitrogen content as well as plant and fungal gene expression, we tried to identify the possible mechanisms of nitrogen-induced susceptibility to the rice blast fungus, Magnaporthe oryzae. This lead us to evaluate the effect of an exogenous application of a mixture of amino acids on disease susceptibility.

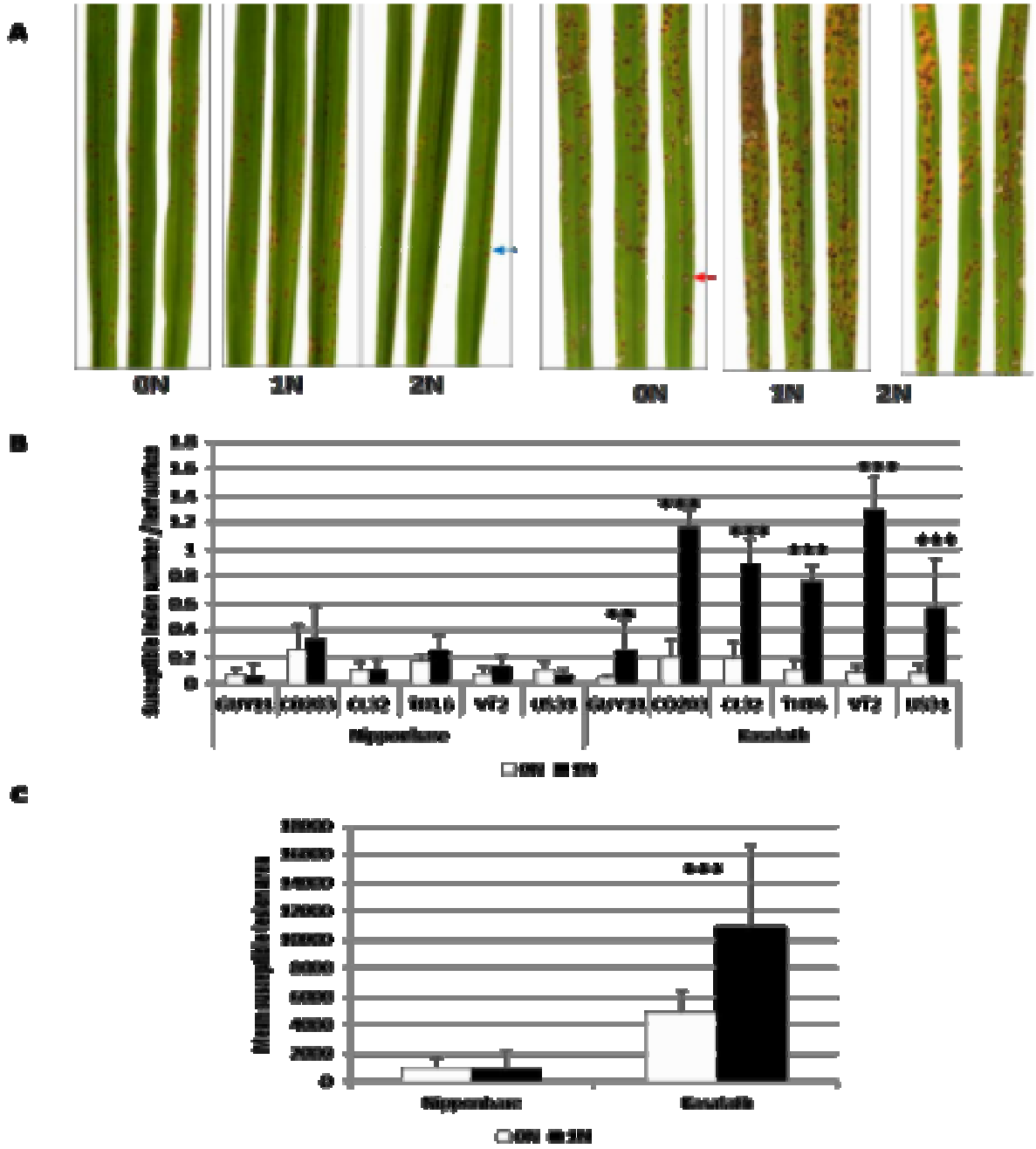


Figure 1. Nitrogen supply and rice blast disease in Nipponbare and Kasalath genotypes

Different doses of nitrogen (0N, 1N or 2N) were supplied to rice 1 day before inoculation with Magnaporthe oryzae. A. Symptoms 7 dpi with the fungal isolate GUY11 on Nipponbare (left) or Kasalth (right). The blue and red arrows indicate lesions typical respectively of resistance and susceptibility. B. Susceptible lesion number measured with six different isolates on Nipponbare and Kasalath. The mean and sd of three replicates is shown. This experiment was repeated two times and one representative replicate is shown. ***: Student test; $p<0.001$. C. The surface of individual susceptible lesions were measured (n= approx. 240 for each condition). ***: Student test; $p<0.001$.

RESULTS

Nitrogen supply and enhanced rice blast susceptibility

We first set up a simplified system under controlled conditions for enhancing susceptibility under high nitrogen. Since it is the genome of reference, we selected Nipponbare (temperate japonica type) for testing the effects of nitrogen fertilization. We also included the Aus genotype Kasalath as this line is known to have a significant different nitrogen use efficiency compared to other rice genotypes (Namai et al. 2009). We first tested several doses of the fertilizer routinely used in the laboratory on disease levels caused by the virulent GUY11 isolate of Magnaporthe oryzae. As can be seen in figure 1A, disease symptoms as measured by the number of susceptible lesions (red arrow on Figure 1A) on Kasalath plants were significantly increased with increasing levels of nitrogen, with little differences between one or two doses of the usual fertilization. In all further experiments, we thus compared the effect of no nitrogen (0N) versus one dose of nitrogen (1N). We reproducibly observed from 2 to 6 times more lesions for the GUY11 isolate (Figure 1B). In contrast, disease severity in the Nipponbare genotype against the GUY11 isolate was not affected. Not only lesion number increased but also lesion size, up to 2.2-fold (figure 1C). This is consistent with what was found by Otani (1959).

To evaluate if the observed effects of nitrogen supply were specific to the GUY11 isolate, we further tested rice blast isolates that were virulent on both Kasalath and Nipponbare. By this way we should measure the effect of nitrogen supply on quantitative resistance rather than on major resistance genes. Nitrogen supply did not trigger any significant increase of susceptibility in Nipponbare, with the exception of the FR13 isolate (Suppl Figure 1B) which could not been tested in Kasalath as it is avirulent on this genotype. By contrast in Kasalath, disease severity was higher with the six isolates of M. oryzae tested after nitrogen supply (Figure 1B; Suppl Figure 1). The increase in lesion number triggered by nitrogen supply varied from one isolate to another, with a maximum of 17-fold with the VT2 isolate and a minimum of 5-fold with the CL32 isolate. We also observed that the number of necrotic lesions typical of a resistance reaction (blue arrow in Figure 1A) also increased for most isolates. This protocol also induced enhanced susceptibility in a large range of rice genotypes (data not shown; See Ballini et al, this issue). Thus our protocol for inducing susceptibility by nitrogen supply generally increases susceptibility to rice blast. To differentiate between the observed increase of susceptibility in the field (« Koe-imochi »:

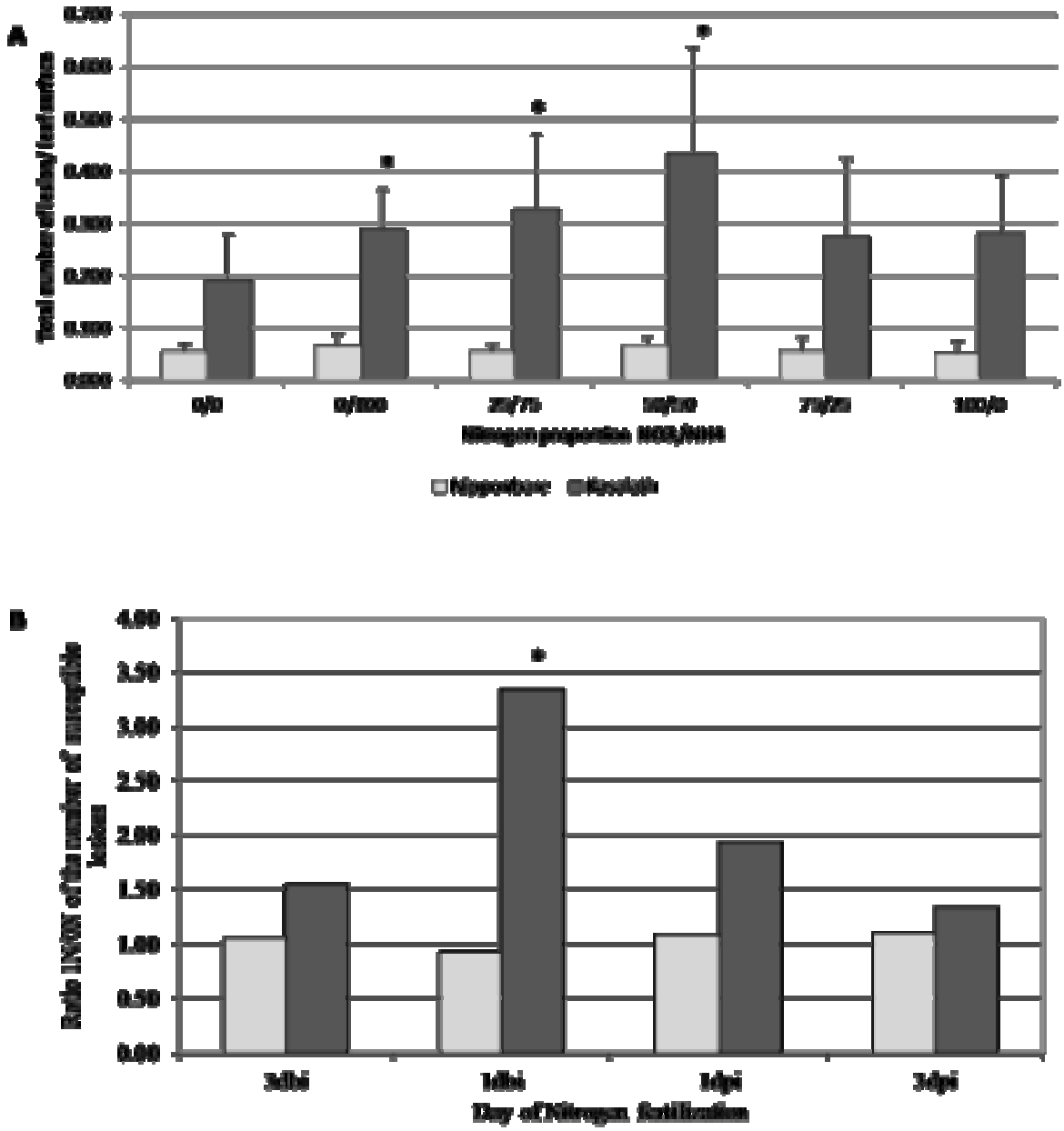


Figure 2. Percentage of nitrate/ammonium and timing for nitrogen supply

Nitrogen was supplied under different conditions and the plants were subsequently inoculated with the GUY11 isolate. Symptoms were measured 7 dpi on Nipponbare (light grey) or Kasalath (dark grey). Mann and Whitney test was applied to compare each condition to the 0/0 condition; *: $p<0.05$. A. The indicated ratios of nitrate/ammonium were applied 1 day before inoculation. This experiment was repeated 3 times and one representative experiment is shown. The mean and sd of three replicates are shown. B. The 0N and 50/50 ammonium/nitrate solutions were applied at the indicated time before inoculation. The value indicated is the ratio of susceptible lesions between 0N and 50/50 (1N) treatments. This experiment was repeated 3 times and gave similar results.

Bonman 1992; Otani 1959; Ou 1972; Tanaka 1961) and our experimental system, we termed this phenomenon Nitrogen-Induced Susceptibility, or NIS.

Setting-up the form and timing of nitrogen supply for enhanced rice blast susceptibility

We next clarified the type of nitrogen (ammonium and/or nitrate) and the timing of application that was most favorable to the enhancement of blast disease. First the form of nitrogen was tested (Figure 2A). As shown in Figure 2A, ammonium seemed to better induce susceptibility than nitrate, consistently with previous report (Otani 1959). The maximum level of susceptibility was found with a 50/50 proportion of ammonium/nitrate. This ratio was thus used in all further experiments.

In his pioneer experiments, Otani (1959) tested the effect of nitrogen supply at different times before inoculation with rice blast. In our case, we found that nitrogen supply 1 day before inoculation (1 dbi) was optimum to induce susceptibility (Figure 2B). Similarly to Otani (1959), 2 dbi also induced susceptibility (data not shown); however, we could not measure significant effects of nitrogen supply added earlier than 3 dbi, in contrast with the prolonged effects observed by Otani up to 8 dbi. Thus our protocol induces a transient increase in susceptibility to rice blast. We extended this type of analysis and also tested the effects of nitrogen supply after inoculation. Although we could measure an increase of susceptibility when nitrogen was added in the soil 1 day post inoculation (dpi), this effect could not be observed reproducibly. This was similar to other reports (Ishiguro et al. 1992). Nipponbare was never more susceptible, irrelevantly of the date of nitrogen supply.

Therefore our system triggers the already described phenomenon of nitrogen-induced susceptibility to rice blast (Otani 1959). The data also show that ammonium/nitrate supply 1 dbi increases by at least two-fold lesion size and number in the Kasalath genotype.

Cytological events accompanying nitrogen-induced susceptibility

We monitored the growth of the isolate GUY11 in Kasalath and Nipponbare plants at different time points after inoculation (1 dpi, 2 dpi and 4 dpi) and under 0N and 1N conditions. Indeed, up to now, there has been no examination of the effects of nitrogen supply on the growth of the blast fungus before and after penetration in the rice leaf. As shown in Figure 3A, we observed no difference in Nipponbare between the 0N and 1N conditions. This is consistent with the absence of increased susceptibility in this cultivar (Figures 1 and 2). In contrast, several significant differences were found in Kasalath plants in three independent

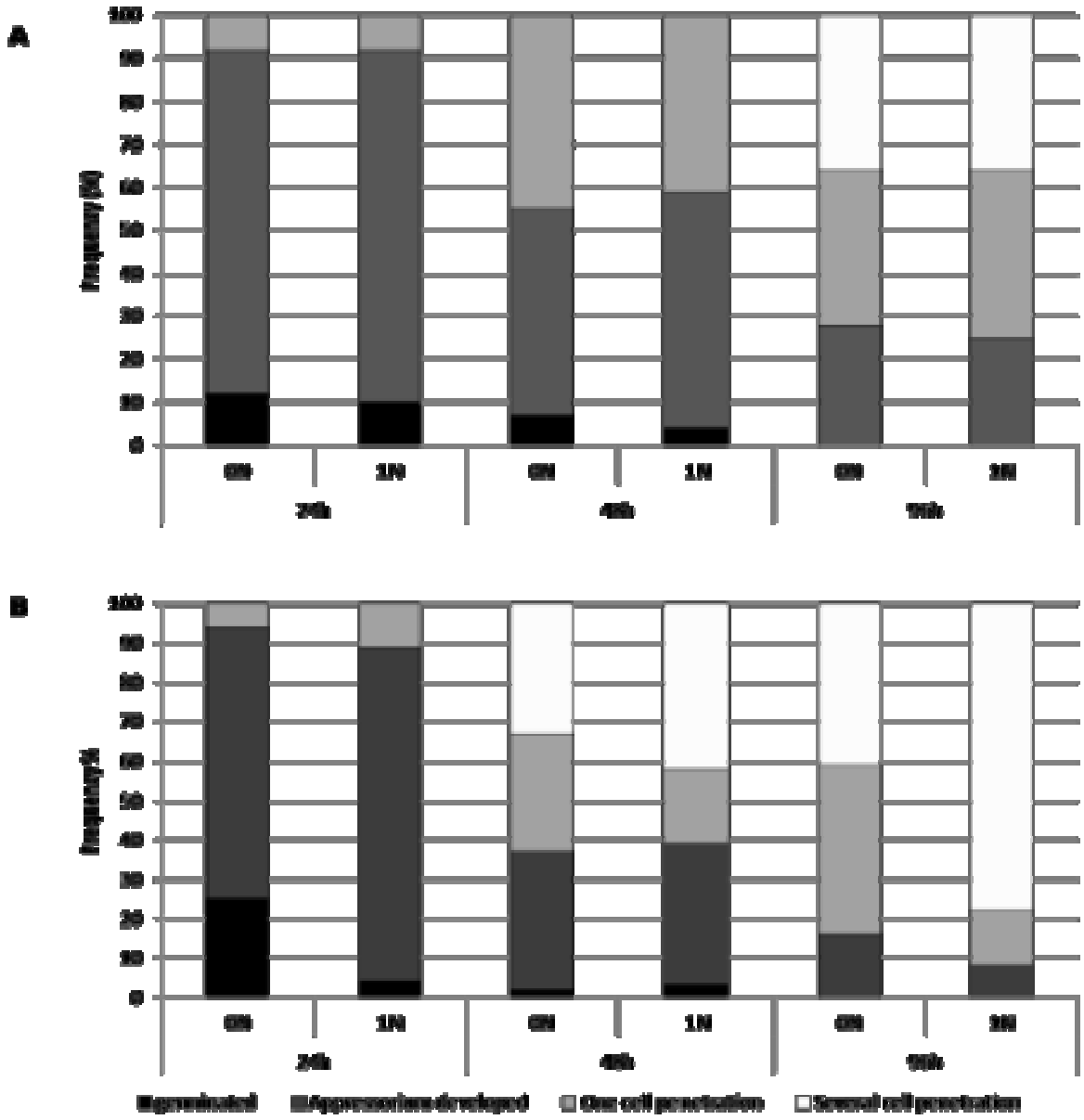


Figure 3. Penetration and growth of M. oryzae in rice plants under different nitrogen regimes

Different nitrogen regimes (0N and 1N) were applied to Nipponbare (A) and Kasalath (B) plants which were subsequently inoculated with the GUY11 isolate. At the indicated time after inoculation (24, 48 and 96 hpi), the developmental stage of the fungus was evaluated. Four types of situations were counted: spores that germinated but did not develop an appressorium (black), spores with a developed appressorium (dark grey), sites where the fungus had penetrated one cell (light grey) and sites where the fungus had penetrated several cells (white). For each combination, a total of 100 events were counted. This experiment was repeated three times and one representative experiment is shown. A Chi square test was used to compare the different percentages (see text).

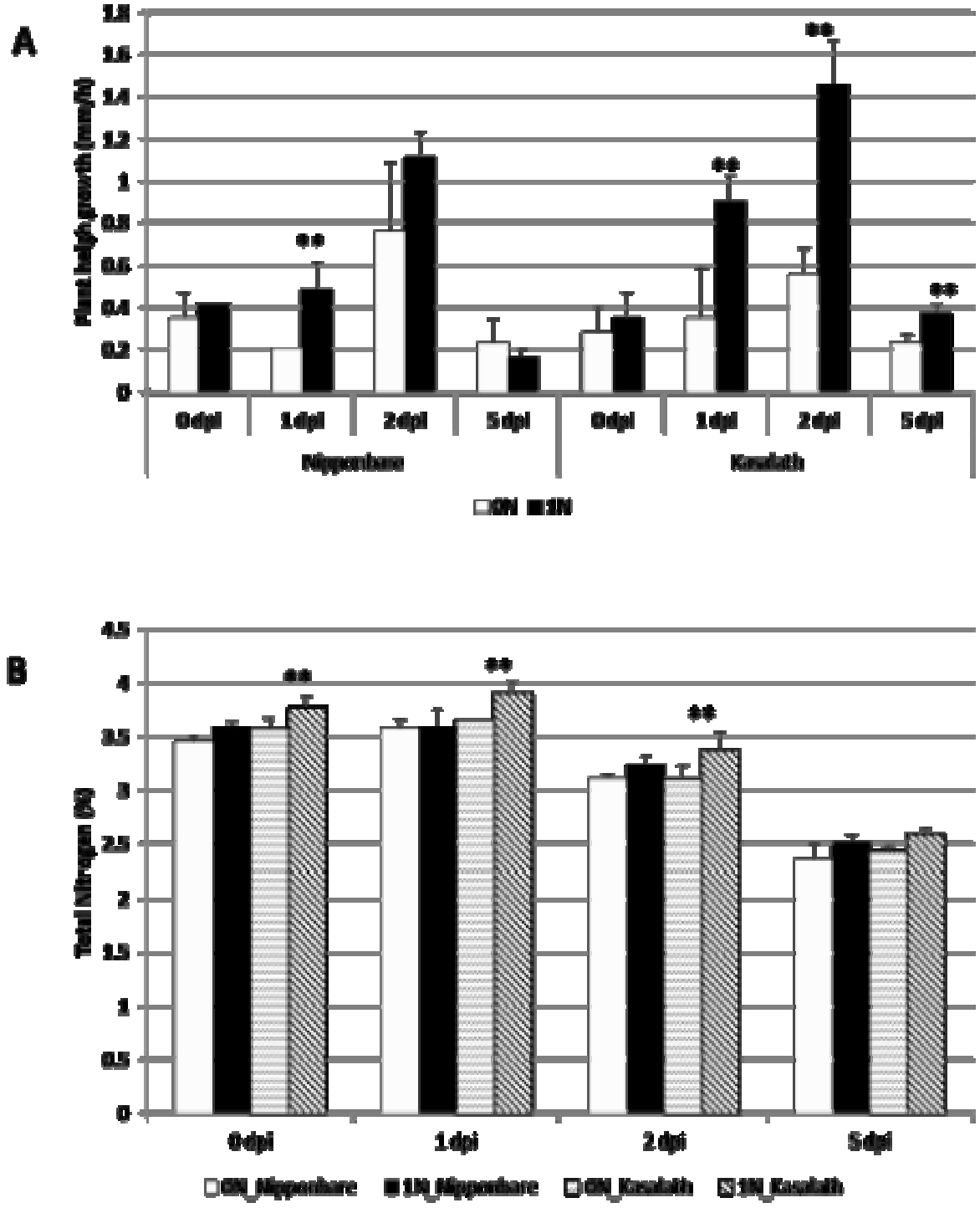


Figure 4. Plant growth and total nitrogen content under variable nitrogen regimes

Plant height growth (A) and total nitrogen content (B) were measured before and during the infection of rice plants (Nipponbare and Kasalath) with the GUY11 isolate. Different nitrogen regimes (0N or 1N) were applied one day before inoculation. The mean and sd of three biological replicates are shown. A Mann and Whitney tests was used to compare the 0N and 1N conditions; **: $p<0.01$.

experiments (one experiment showed in Figure 3). First at 1 dpi, 85% of the spores developed appressorium under 1N conditions compared to 70% under 0N conditions. Thus the fungus seems to grow faster on the leaf surface of plants that were supplied with nitrogen (Chi^2 test; p value<0.001). This difference in fungal growth is no longer observed at 2 dpi as the fungus has penetrated in 60-65% of the cases, irrelevantly of the nitrogen regime. Thus the final penetration efficiency does not seem to be affected by nitrogen supply. Finally, at 4 dpi, right before the first symptoms appear on the leaf surface, we could measure a significant difference in the percentage of cells that each individual colony had invaded (Chi2 test; p value<0.001). Whereas 45% of the fungal colonies invaded several cells under the 0N condition, more than 80% could be observed under the 1N condition. Therefore the growth of the blast fungus inside the plant cells is higher after nitrogen supply but penetration does not seem to be affected.

Plant growth and total nitrogen content after nitrogen supply

As a first tentative to explain the observed differences in fungal growth and symptoms, we then evaluated the effect of nitrogen supply on plant growth and total nitrogen. Indeed blast disease is highly dependent on the developmental stage of the plant (Vergne et al. 2010) and several conflicting evidences suggest a correlation between total nitrogen content and blast susceptibility (Otani 1959; Talukder et al. 2005b).

Total height of the plants was measured along the experiments, before and after nitrogen supply as well as during the infection process. The speed of growth was then calculated for both Kasalath and Nipponbare under different nitrogen regimes (Figure 4A). At the end of the experiment, Nipponbare showed no increase in size whereas we observed a 10% increase of the height of Kasalath plants (Suppl Figure 2).This is similar to what Otani (1959) observed. This increase in size could be explained by an increase in the speed of growth (Figure 4A) in particular at 1 and 2 dpi. Thus an increased plant growth at 1 and 2 dpi precedes the increase in fungal growth observed at 4 dpi (Figure 3A).

We next measured total nitrogen content (Figure 4B). First one can observe that 5 dpi (that is 6 days after nitrogen supply) the level of total nitrogen reaches a minimum level. This indicates that most of the nitrogen routinely supplied before the final nitrogen input (one day before inoculation) has been used by the plant. Total nitrogen content was significantly different between 0N and 1N at all time points in Kasalath and was higher by up to 8.5%

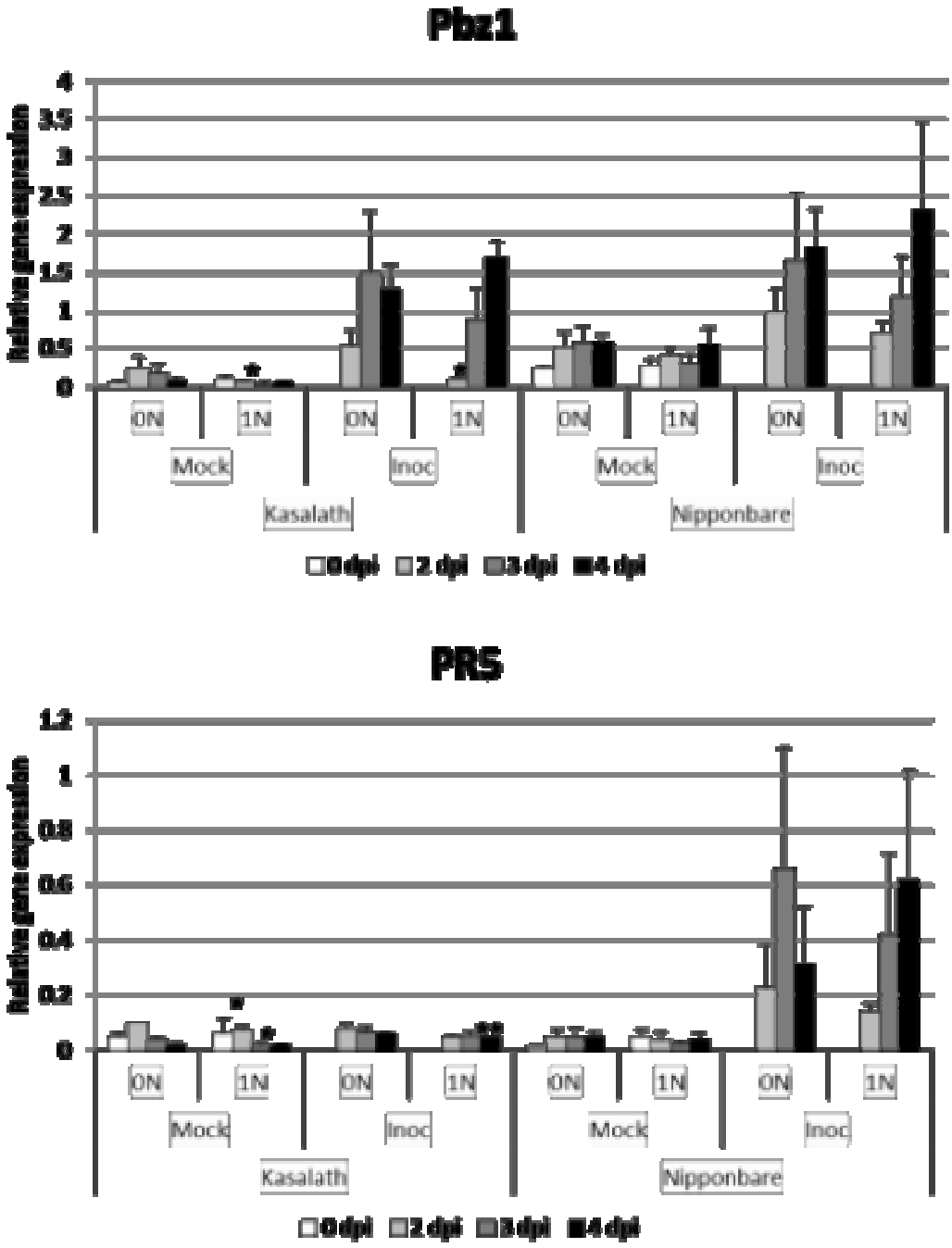


Figure 5. Defense gene expression in rice under different nitrogen regimes

One day before inoculation with GUY11 (Inoc) or a solution without spores (Mock), the plants were supplied with either 0N (white bars) or 1N (black bars) nitrogen regimes. Gene expression was measured and normalized using the actin gene before infection and at the different time points after inoculation. The mean and sd values from three biological replicates are shown. A Mann and Whitney test was used to compare the 0N and 1N treatments for each situation (Mock or inoculation); *: $p<0.05$.

under the high nitrogen regime. Thus, a slight increase in total nitrogen content precedes the increase in fungal growth observed at 4 dpi (Figure 3A).

Gene expression upon nitrogen supply

We next monitored several markers of the disease resistance pathway (Delteil et al. 2010) under 0N and 1N conditions in Nipponbare and Kasalath. Since it has been shown that constitutive expression of defense-related genes is a hallmark of quantitative resistance (Vergne et al. 2010), we measured the expression of a representative set of defense-related genes. Before inoculation (Figure 5), there was no difference between 0N and 1N for the PBZ1 and PR5 genes. Similar results were observed with nine other marker genes (data not shown) selected from (Delteil et al. 2010). Similar results were obtained in other cultivars (Suppl Figure 3 and data not shown). This suggests that constitutive expression of defense-related genes is not affected by nitrogen supply.

We also measured the expression of these genes after infection (2, 3 and 4 dpi). In the non-infected controls, despite some minor differences in the level of expression, there was no striking difference between 0N and 1N. Similarly, in the infected samples, the genes tested showed similar expression levels and patterns between 0N and 1N. Thus we could not find any significant difference in Kasalath or Nipponbare between the 0N and 1N conditions for the 11 genes tested after infection (two representative genes are shown in Figure 5). Similar results were obtained in other cultivars (Suppl Figure 3 and data not shown). Therefore, the induction of defense as measured by our marker genes does not seem to be massively altered by nitrogen supply.

We also measured the expression of several pathogenicity-related genes of M. oryzae. For these experiments, we chose the interaction between Nipponbare and the virulent isolate FR13. This isolate is extremely virulent on Nipponbare, thus allowing significant detection of fungal RNA in plant tissues. Moreover, nitrogen induced enhanced susceptibility in Nipponbare (Suppl Figure 1B). The MG4 gene used to measure fungal growth indicated no significant difference in fungal growth until 3 dpi, suggesting that as for Kasalath infected with GUY11, there is no difference in fungal growth between 0N and 1N conditions at these time points (Figure 3B). We tested three genes, MPG1, T4H and Spm1 that are known to be induced by nitrogen starvation in vitro (Donofrio et al. 2006). MPG1 and T4H, but not Spm1, were expressed to higher levels in the 0N condition than in the 1N condition. Thus this suggests that the fungus perceives the 1N condition as a nitrogen-rich environment.

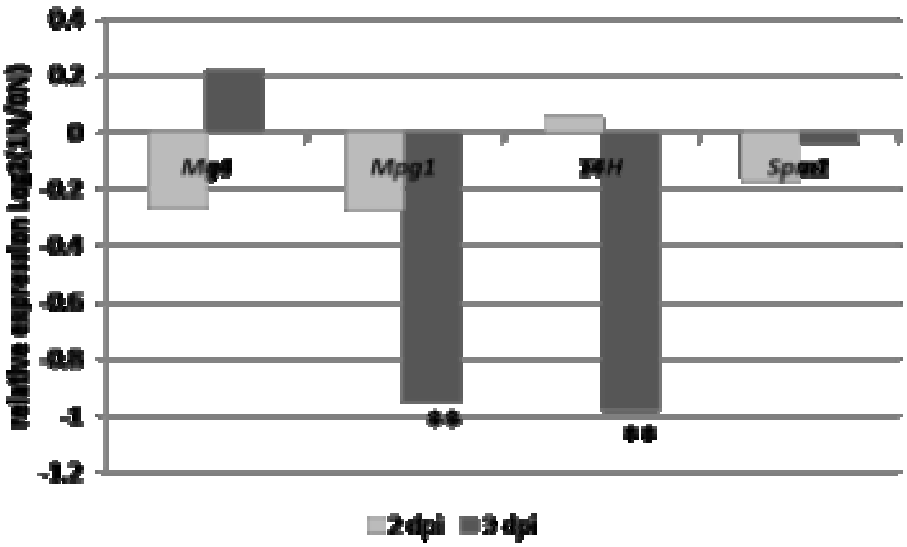


Figure 6. Fungal gene expression in plants grown under different nitrogen regimes

One day before inoculation with the virulent FR13 isolate, Nipponbare plants were supplied with either 0N or 1N nitrogen regimes. Fungal gene expression was measured 2 and 3 days post inoculation using RT-qPCR and normalized with the plant actin gene. The Log2 ratio between the 0N and 1N conditions is shown. Three biological replicates were done and a Mann and Whitney test was used to compare the 0N and 1N conditions; **: $p<0.01$.

Exogenous application of amino acids and blast disease

Since we observed differences in total amino acid content in leaves between 0N and 1N conditions in Kasalath but not Nipponbare (Figure 4B) and an increase in growth of the fungus inside Kasalath but not Nipponbare plants (Figure 3B), we reasoned that the nutrient sources normally limited in 0N were no longer limiting in the 1N regime in Kasalath but not in Nipponbare. Under this hypothesis, we would expect that an exogenous treatment with a mixture of amino acids could provoke NIS in Kasalath and Nipponbare under the 0N regime. We used previous report by Otani (1959) to select glutamine, glutamate, asparagine, aspartate, leucine and valine as potentially important amino acids. We applied a mixture of 1mM amino acids on plants grown under the 0N regime either at the time of inoculation (0 dpi) or 1 dpi. As shown Figure 7A, the treatment with a mixture of amino acids 1 dpi strongly induced susceptibility. This amino acid treatment increased the number of lesions in both Nipponbare and Kasalath to similar levels than those reached with the 1N classical treatment (Figure 7B). At the cellular level, this was mirrored by an increase of fungal growth visible at 2 dpi (Figure 7C). The observation that the exogenous treatment with amino acids at the time of inoculation did not affect susceptibility indicates that free amino acids do not have a prolonged effect (<2 day) on fungal growth. It also suggests that amino acids availability is not limiting at the pre-penetration stage. Thus an exogenous application of amino acids mimics Nitrogen-Induced Susceptibility to rice blast disease.

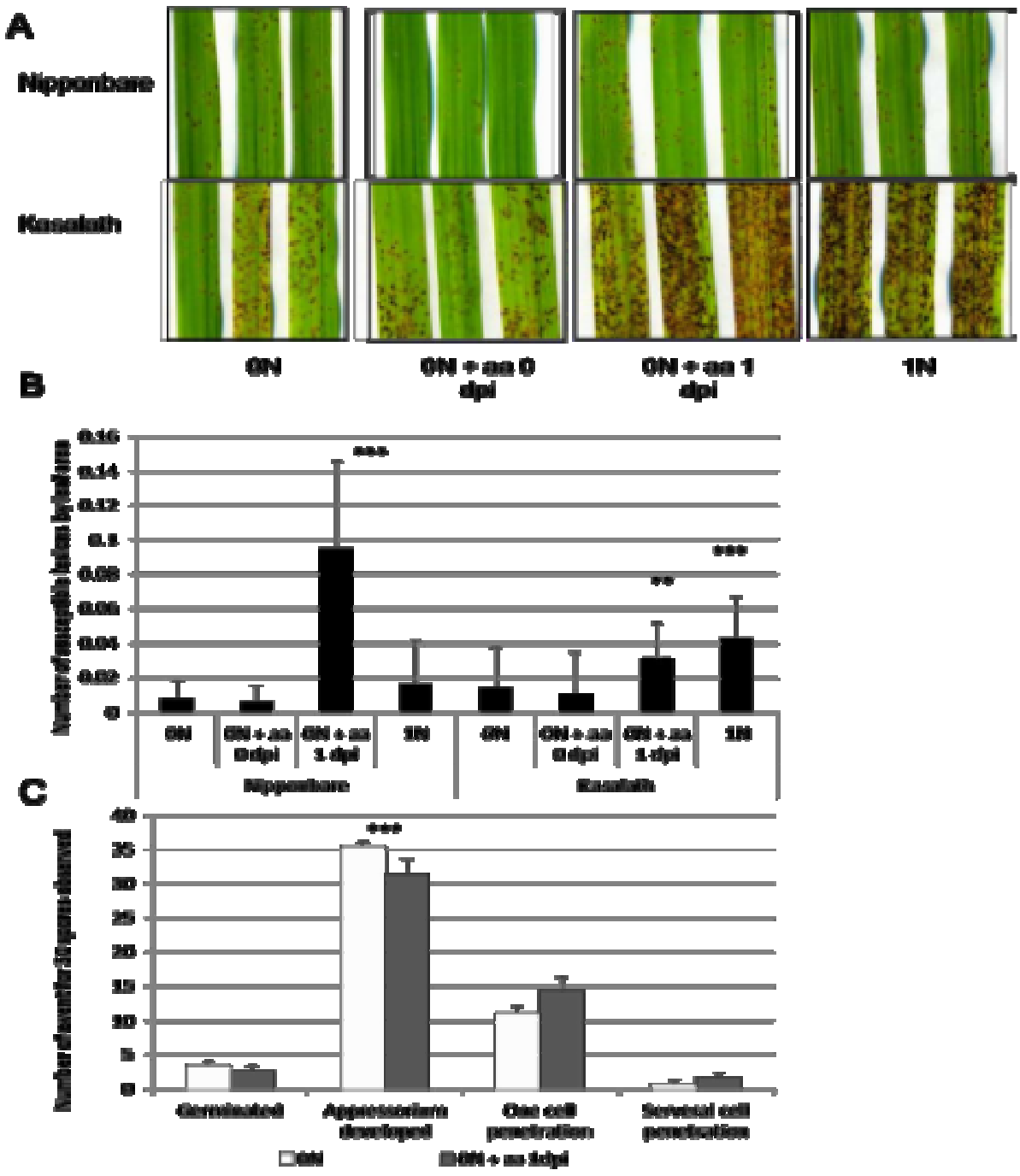


Figure 7. Blast susceptibility under exogenous application of amino acids

Rice plants were grown under 0N or 1N regimes as indicated and inoculated with the GUY11 isolate of M. oryzae. At the indicated time (0 or 1 day) after inoculation, a mixture of amino acids (1 mM of each Leucine, Valine, Glutamate, Glutamine, Aspartate and Asparagine; final pH 5.5) was applied. Symptoms were scored at 7 dpi (A), susceptible lesions were counted (B) and cytological events examined 2 dpi (C). Three biological replicates were done and a Mann and Whitney test was used to compare the different situations to the 0N condition (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$).

DISCUSSION

There are several reports showing a negative impact on rice resistance against the fungus Magnaporthe oryzae. However, the associated cellular events and possible mechanisms responsible for this enhancement of susceptibility are poorly documented or understood. We developed a simplified system for inducing susceptibility to rice blast fungus. We show that adding ammonium/nitrate in a 50/50 ratio to the Kasalath genotype, one day before inoculation, is best to induce susceptibility (Figure 1 and 2). We could not reproducibly induce susceptibility by supplying nitrogen in the soil after infection (Figure 2B). This effect was not isolate specific but instead was visible for all M. oryzae strains tested (Figure 1B and Supplemental Figure 1A). Because we used normally virulent isolates, the observed effects are unlikely due to the breakdown of major resistance genes known to function in this system (Ballini et al. 2008b). Whether nitrogen impairs major resistance genes remains to be established (see Ballini et al, this issue). However, the effect of nitrogen depended on the rice genotype as Nipponbare showed no increase of susceptibility to most of the isolates tested under high nitrogen (Figure 1A and Suppl Fig 1). Understanding the genetic basis for this robustness to high nitrogen should be therefore amenable, in particular using available mapping populations between Kasalath and Nipponbare (See Ballini et al., this issue).

For the first time, M. oryzae growth was monitored to try to explain why the lesion number (Figure 1B) and size were increased after nitrogen supply (Figure 1C). We observed that fungal growth and penetration rate was higher under high nitrogen 1 dpi (Figure 3B). This difference could be explained by higher nitrogen content of the leaf (Figure 4B) but not by a reduction of the expression of the defense genes tested (Figure 5 and Supplemental Figure 3B). High nitrogen has been demonstrated to reduce silicon physical barrier in the epidermal cells (Otani 1959). Thus growth enhancement of the fungus on the leaf surface could be due to reduced physical resistance as well as to higher total amino acid availability. However, the penetration rate measured at 2 dpi was similar between the 0N and 1N conditions. Thus despite initial differences between low and high nitrogen, the fungus seems to reach similar developmental stages at 2 dpi under 0N and 1N. We conclude that the increase in visible lesion number does not result from increased penetration events but rather results from increased growth within each individual infection site. Such an increase in growth of the fungus may trigger larger necrotic zones that become visible by eye.

An increase of total nitrogen content has been associated with induced susceptibility to rice blast. For instance, an increase of total nitrogen content of 22% was measured by Otani

(1959) and 78% by Talukder (2005b). In our experimental system, an increase of 8.5% (Figure 4B) of total nitrogen was sufficient to strongly induce susceptibility. Gene expression analysis indicated that M. oryzae perceives the 1N condition as a nitrogen-rich environment (Figure 6). This may explain increased growth of the fungus as it is known that some amino-acids are limiting for full pathogenicity (Wilson et al. 2012). By treating plants after inoculation with a mixture of free amino acids, we could mimic NIS (Figure 7). This effect can be a direct consequence of increased availability of amino acids but could also result from indirect effects of applying amino acids on leaves. Indeed, Glutamine and Glutamate levels are tightly regulated in plants (Xu et al. 2012). Evaluating the pathogenicity of Magnaporthe mutants displaying auxotrophy to certain amino acids would allow establishing which amino acids are limiting in planta. Thus a simple trophic relationship could explain why the fungus is growing better under high nitrogen regime.

According to available knowledge on fungus biology in vitro, a nitrogen-rich environment should turn down many pathogenicity genes. This is what we observed for the MPG1 and T4H Magnaporthe genes (Figure 6), supporting the hypothesis that even in planta some pathogenesis genes are less expressed under high nitrogen concentrations. This reduction of pathogenicity gene expression while disease symptoms increase still remains a paradox.

Our experimental system did not affect tillering during the course of infection (data not shown). However, nitrogen supply increased the plant growth rate of the Kasalath cultivar but not Nipponbare (Figure 4A). In particular in Kasalath, the plant growth rate was increased by 2.4-fold at 2 dpi. Thus there is a strong change in growth that precedes the change in fungal growth observed at 4 dpi (Figure 3B). Whether this change also affects leaf elongation rate remains to be established, although the total leaf surface at the end of inoculation was not affected by nitrogen supply in our experiments (data not shown). These observations argue for a possible impact of cellular growth on nitrogen-induced susceptibility.

Only very limited information exist on the expression of disease-related genes upon simultaneous nitrogen supply and under pathogen attack. In rice, PR5 protein was shown to be strongly induced 5 dpi under high nitrogen (Konishi et al. 2001a). We did not observe such an increase in gene expression for PR5 gene (Figure 5 and Supplemental Figure 3). There are several reports indicating that nitrogen starvation in rice induces the expression of defense-related genes. For instance, Lian et al (2006) showed that in roots under nitrogen starvation, the PBZ1 gene was rapidly induced. Similarly, Cai et al (2012a) recently showed that more

than 532 genes were induced in rice shoots after 24 h of nitrogen starvation. We analyzed the overlap between these 532 genes and known defense-related and disease regulators of rice using the Archipelago database (Ballini et al. 2009). This comparison indicates that 54% of the genes identified by Cai et al (2012) are found in the Archipelago database (data not shown), clearly demonstrating an enrichment of this type of defense-related genes among genes that are up-regulated by nitrogen starvation. Based on this observation, we postulated that high nitrogen supply, conversely, would repress the expression of defense-related genes, in particular some found by Cai et al (2012) and Lian et al (2006), respectively PR5 and PBZ1. Contrary to our expectation, defense gene expression was not massively down-regulated by high nitrogen before infection or during infection (Figure 5 and Supplemental Figure 3). We therefore conclude that the tested defense pathways are not strongly affected at the transcriptional level under high nitrogen regime.

Several hypotheses have been raised to explain nitrogen-induced susceptibility of rice blast. Here we show that although fungal growth is increased on the leaf surface, the penetration rate of the fungus is not finally affected and cannot thus explain the observed increase in lesion number. The increase of total nitrogen content seems to be perceived by the fungus and the availability of some amino acids could be responsible for nitrogen-induced susceptibility. Quite surprisingly, the induction of known defense systems was not affected in our experiments. Finally, the system we developed and new available RNA Seq technologies open the possibility to explore in more detail the impact of nitrogen on fungal pathogenicity.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth and fertilization procedure

Plants were sown on Wednesdays in Neuhaus S soil in which poudzolane was added (2L/70L1N). Our routine fertilization solution containing nitrogen source and corresponding to a ratio of 75% NO3-/25% NH4+ (Suppl Table 1) was supplied every Monday for 3 weeks; the fourth week after sowing, we supplied either the fertilization solution (NO3-/NH4+ ratios depending on the experiments) or the same solution without nitrogen source and corresponding to the 0N condition (Suppl Table 1). This fourth fertilization was done at different time before inoculation in the experiment described in Figure 2. For all other experiments, the fertilization was supplied 1 day before inoculation.

Plant inoculation and disease assessment

Plants were inoculated with spore suspensions as described in (Berruyer et al. 2003). For gene expression studies, we also used a mock treatment corresponding to the solution into which spores are re-suspended (ie 1% gelatin solution). Five to seven days after inoculation, the symptoms were scanned and the number of susceptible (red arrow on Figure1A) or resistant (blue arrow on Figure 1A) lesions were counted using ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Total nitrogen measurement

Plant tissues were harvested before and after fertilization. They were oven dried about 48hrs at 65 °C. Total nitrogen was analyzed in the samples by the Cirad analysis laboratory US49 in Montpellier. The content in nitrogen was established by a thermoelectric cell after burning in a furnace at 900°C under an oxygen flow according to the Dumas method (Edeling et al. 1968).

RNA extraction and RT-PCR analysis

For RT-QPCR applications, frozen tissue was ground in liquid nitrogen. Approximately 500 µl of powder was then treated with 500 µl TLES buffer (Tris PH8100 mM, LiCl 100 mM, EDTA PH8 10 mM and SDS 1%), 500 µl warmed water saturated phenol (Gen-Apex®), and vortexed for 30 s. A volume of 500 µl of $CHCl_3$: isoamylalcohol (24:1) was then added and the samples were vortexed for 30 s. The samples were then centrifuged (30 min, 13 000 rpm) and the RNA was precipitated from the supernatant overnight using one volume LiCl 4 M.

RNA pellets were then washed with 70% ethanol and resuspended in distilled water. RNA samples (5 µg) were denaturated for 5 min at 65°C with oligo dT (3.5 µM) and dNTP (1.5 µM). They were then subjected to reverse transcription for 60 min at 37°C with 200 U of reverse transcriptase M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), and DTT (5 mM) in 20 µl of the appropriate buffer. Two microliters of cDNA (dilution 1/30) were then used for quantitative RT-PCR. Quantitative RT-PCR mixtures contained forward and reverse primers (300 µM), and Roche qPCR SYBR Green Master Mix as per the manufacturer's recommendations (Roche, Meylan, France). Amplification was performed as follows: 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 15 s, 62°C for 15 s and 72°C for 15 s; then 95°C for 1 min and 55°C for 30 s. The quantitative RT-PCR (QRTPCR) reactions were performed using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche) and data were extracted using the LC480 software. The amount of plant RNA in each sample was normalized using actin (Os03g50890) as internal control. PCR primers are provided in Supplemental Table 2.

Tissue staining for confocal observation

Inoculated plant tissues were harvested and fixed in fixation buffer (ethanol/$CHCl_3$ 3:1, 0.15% acetic acid) 18h at room temperature. Fixed tissues were washed with ethanol 50% then put in distilled water. Tissues were cleared with NaOH 0.05M during 15 min at 90°C. Cleared tissues were washed two times with distilled water, then incubated with TrisHCl (0.1M, pH 5.8) during 30min at 90°C, then washed again with distilled water and PBS 1X two times during 10 min. Fungal chitin on tissues was stained with WGA Alexa 488 (0.002%; Invitrogen) overnight in darkness at room temperature. Then, tissues were washed two times with distilled water and PBS 1X during 30 min. Polysaccharides of the plant cell wall were stained with Calcofluor white (0.001 %; Sigma) overnight in darkness at room temperature. Then, tissues were washed two times with distilled water during 30 min. Stained tissues were stored in ETOH 70% glycerol 50%. Observation were performed on LSM700 (ZEISS, http://www.zeiss.com) confocal microscope.

Statistical analysis

Distribution means were compared using the non parametric Kruskal-Wallis' test in case of three and more distributions, and using the non-parametric Wilcoxon's test in case of two distributions (at least one distribution was not normal in every comparison). All tests were performed using XLStat software (http://www.xlstat.com/, Addinsoft).

ACKNOWLEDGEMENTS

NT’s work was supported by a PhD grant from the Vietnamese government. This work was supported by the GARP project from the ANR-SYSTERRA program. We are thankful to Loïc Fontaine for taking care of the plants.

REFERENCES

Ballini E, Morel J-B, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem J-L, Tharreau D (2008) A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. Molecular Plant and Microbe Interaction 21:859-868

Ballini E, Vergne E, Tharreau D, Notteghem JL, Morel JB (2009) ARCHIPELAGO: towards bridging the gap between molecular and genetic information in rice blast disease resistance. Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease. Springer, Dordrecht

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 (612):1139-1147

Bolton MD (2009) Primary metabolism and plant defense—Fuel for the fire. Mol Plant-Microbe Interact 22 (5):487-497

Bolton MD, Thomma BPHJ (2008) The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. Physiological and Molecular Plant Pathology 72 (4-6):104-110

Bonman JM (1992) Durable resistance to rice blast disease - environmental influences. Euphytica 63:115-123

Cai HM, Lu YG, Xie WB, Zhu T, Lian XM (2012) Transcriptome response to nitrogen starvation in rice. J Biosci 37 (4):731-747

Camañes G, Victoria P, Cerezo M, García-Agustín P, Flors V (2012) A deletion in the nitrate high affinity transporter NRT2.1 alters metabolomic and transcriptomic responses to Pseudomonas syringae. Plant Signaling & Behavior 7 (6):619-622

Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, Daniel-Vedele F (2012) Characterization of the Nrt2.6 gene in Arabidopsis thaliana: a link with plant response to biotic and abiotic stress. PLoS ONE 7 (8):e42491

Delteil A, Zhang J, Lessard P, Morel J-B (2010) Potential candidate genes for improving rice disease resistance. Rice 3 (1):56-71

Donofrio NM, Oh Y, Lundy R, Pan H, Brown DE, Jeong JS, Coughlan S, Mitchell TK, Dean RA (2006) Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, Magnaporthe grisea. Fungal Genetics and Biology 43 (9):605-617

Dordas C (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. Agronomy for Sustainable Development 28 (1):33-46

Hayasaka T, Fujii H, Ishiguro K (2008) The role of silicon in preventing appressorial penetration by the rice blast fungus. Phytopathology 98 (9):1038-1044

Ishiguro K, Takechi S, Hashimoto A (1992) Behavior of tricyclazole residue on rice leaves and its efficacy for rice leaf blast control in the field. Ann Phytopath Soc Japan 58Cathy:259-266

Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Urnemura K, Urnezawa T, Shimamoto K (2006) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. Proc Natl Acad Sci U S A 103 (1):230-235

Konishi H, Ishiguro K, Komatsu S (2001) A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. Proteomics 1 (9):1162-1171

Kuerschner E, Bonman JM, Garrity DP, Tamisin MM, Pabale D, Estrada BA (1992) Effects of nitrogen timing and split application on blast disease in upland rice. Plant Disease 76 (4):384-389

Lian X, Wang S, Zhang J, Feng Q, Zhang L, Fan D, Li X, Yuan D, Han B, Zhang Q (2006) Expression profiles of 10,422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assayed using a cDNA microarray. Plant Molecular Biology 60 (5):617-631

Maekawa S, Sato T, Asada Y, Yasuda S, Yoshida M, Chiba Y, Yamaguchi J (2012) The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon/nitrogen response. Plant Molecular Biology 79 (3):217-227

Mathioni SM, Beló A, Rizzo CJ, Dean RA, Donofrio NM (2011) Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and in vitro stresses. BMC Genomics 12 (1):49

Matsuyama N, Dimond AE (1973) Effect of nitrogenous fertilizer on biochemical processes that could affect lesion size of rice blast. Phytopathology 63 (9):1202-1203

Mukherjee AK, Mohapatra NK, Rao AVS, Nayak P (2005) Effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-blasting resistance in rice. J Agric Sci 143:385-393

Namai S, Toriyama K, Fukuta Y (2009) Genetic variation in dry matter production and physiological nitrogen use efficiency in rice (Oryza sativa L.) varieties. Breeding Science 59:269-276

Otani Y (1959) Studies on the relation between the principal components of the rice plant and its susceptibility to the blast disease, 3. Annals of the Phytopathological Society of Japan 16:97-102

Ou SH (1972) Studies on stable resistance to rice blast disease. Rice Breeding:227-237

Ribot C, Hirsch J, Balzergue S, Tharreau D, Nottéghem J-L, Lebrun M-H, Morel J-B (2008) Susceptibility of rice to the blast fungus, Magnaporthe grisea. Journal of Plant Physiology 165 (1):114-124

Robinson RA (1980) New concepts in breeding for disease resistance. Ann Rev Phytopathol 18:189-210

Solomon PS, Tan K-C, Oliver RP (2003) The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. Molecular Plant Pathology 4 (3):203-210

Talbot NJ, McCafferty HRK, Ma M, Moore K, Hamer JE (1997) Nitrogen starvation of the rice blast fungus Magnaporthe grisea may act as an environmental cue for disease symptom expression. Physiological and Molecular Plant Pathology 50 (3):179-195

Talukder ZI, McDonald AJS, Price AH (2005) Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL × environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. New Phytologist 168 (2):455-464

Tanaka I (1961) Analytical studies on the environmental conditions related to epidemics of rice blast disease in Hokkaido. Hokkaido Nat Agr Exp Station 55:1-58

Vergne E, Grand X, Ballini E, Chalvon V, Saindrenan P, Tharreau D, Notteghem JL, Morel JB (2010) Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen Magnaporthe oryzae. BMC Plant Biol 10:206

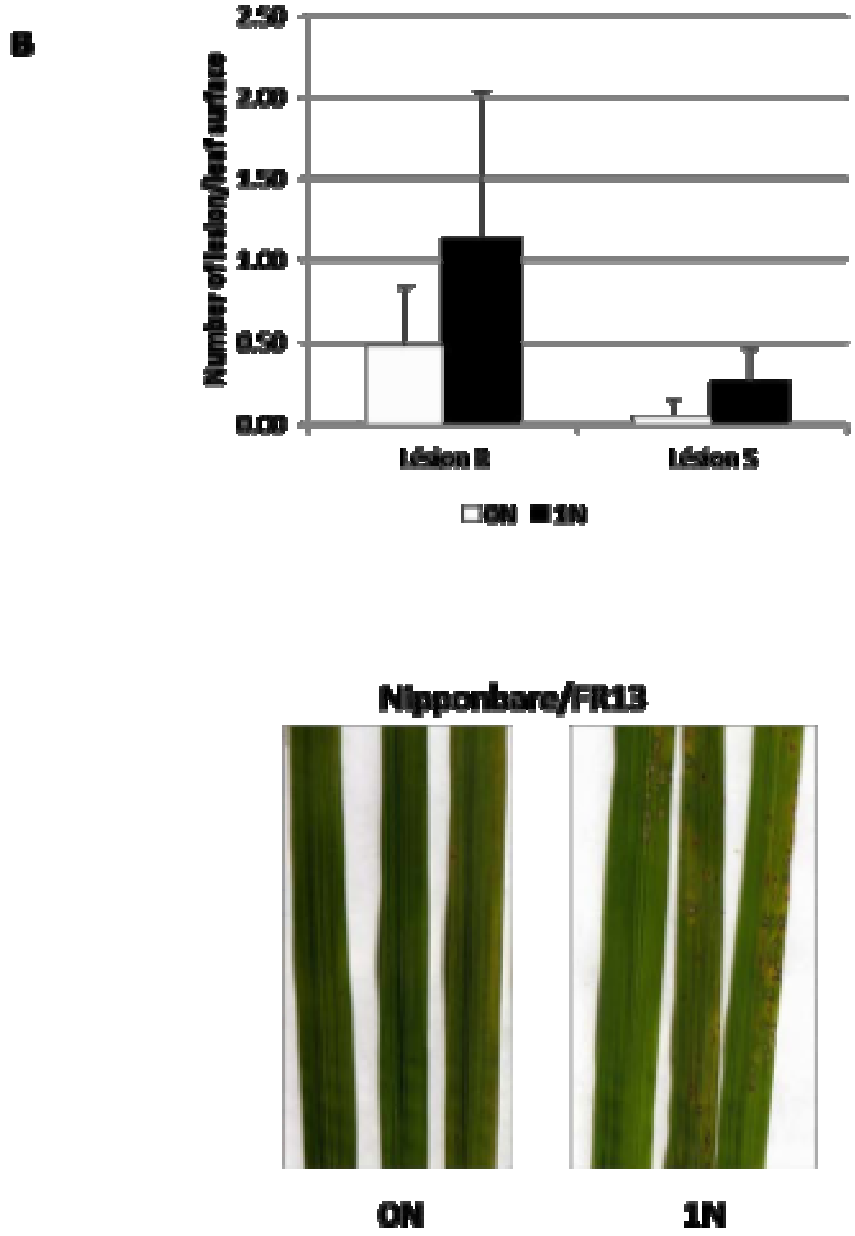
Wang Y, Wu J, Park ZY, Kim SG, Rakwal R, Agrawal GK, Kim ST, Kang KY (2011) Comparative secretome investigation of Magnaporthe oryzae proteins responsive to nitrogen starvation. Journal of Proteome Research 10 (7):3136-3148

Wilson RA, Fernandez J, Quispe CF, Gradnigo J, Seng A, Moriyama E, Wright JD (2012) Towards defining nutrient conditions encountered by the rice blast fungus during host infection. PLoS ONE 7 (10):e47392

Xu G, Fan X, Miller AJ (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annual Review of Plant Biology 63 (1):153-182

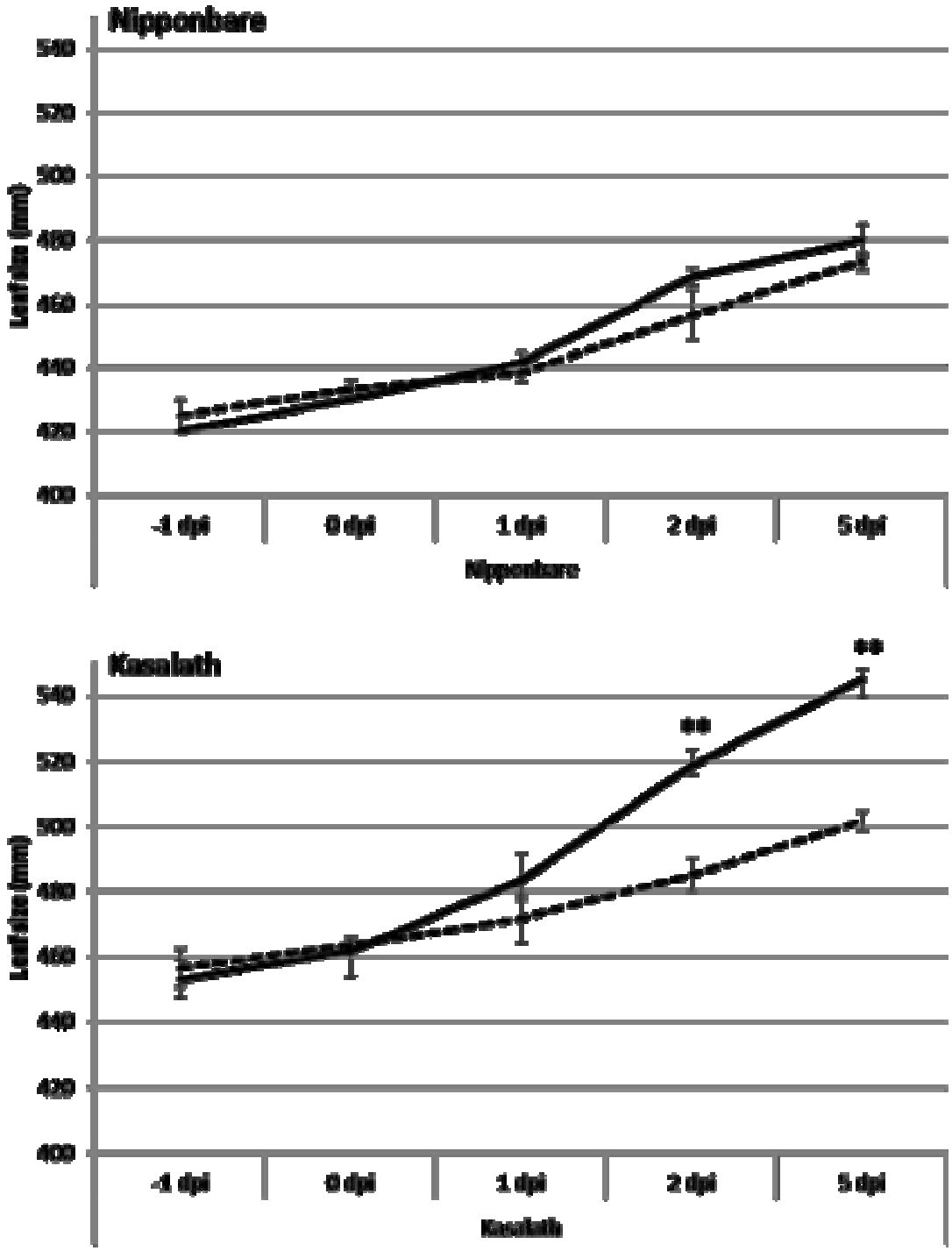
FIGURE SUPPLEMENTAL





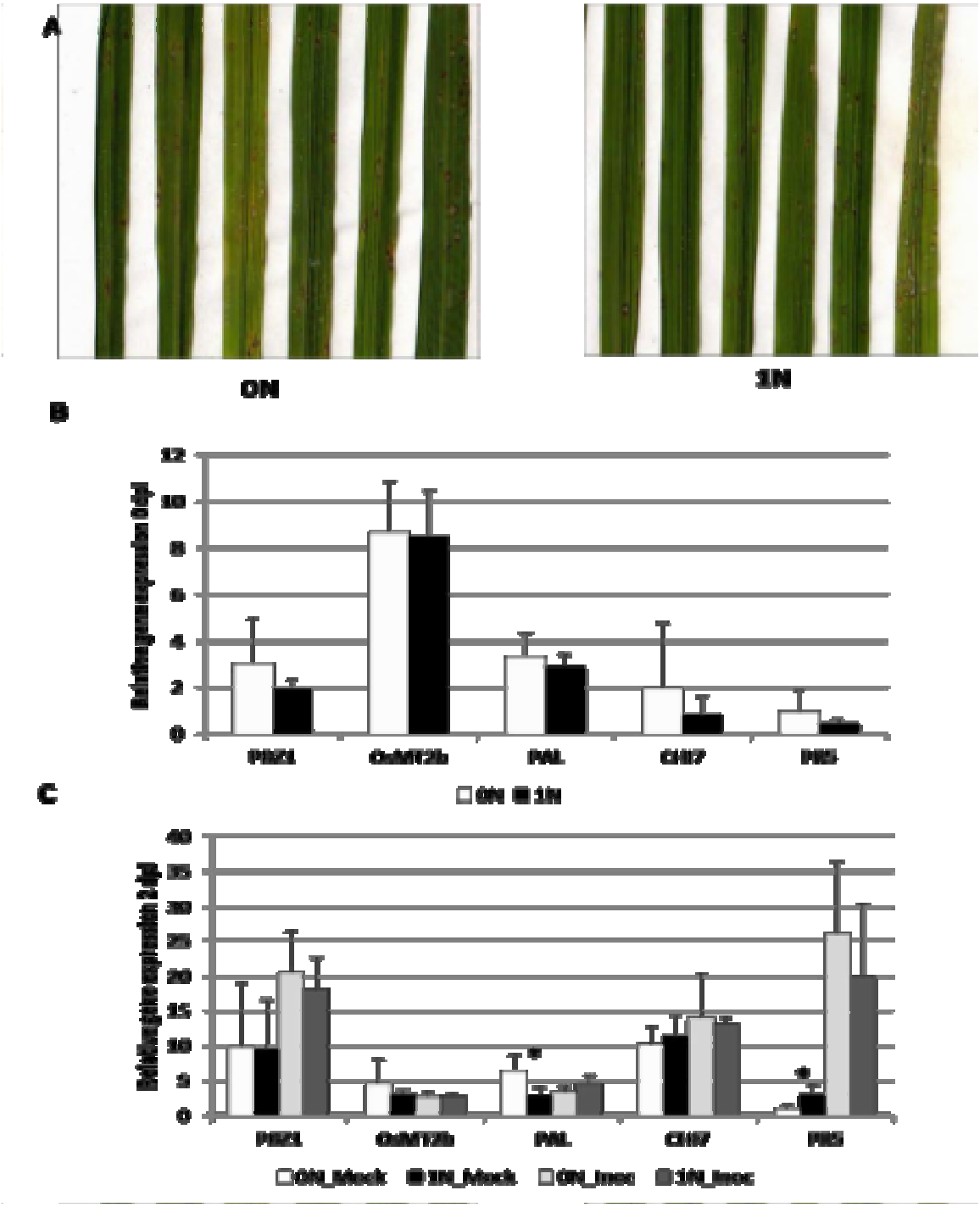
Supplemental Figure 1. Nitrogen-induced susceptibility in Kasalath and Nipponbare

One day before inoculation, plants were treated with either 0N or 1N solutions. Plants were inoculated with different M. oryzae isolates. Np: Nipponbare, Ka: Kasalath. A: The isolates used were CD203, CL32, GUY11, TH16, US31 and VT2. B: the isolate used on Nipponbare (Kasalath was resistant) was FR13 and lesions were counted 7 dpi. The mean and sd of three biological replicates are shown. This experiment was repeated several times and gave similar results; one representative experiment is shown.



Supplemental Figure 2. Plant height under different nitrogen regimes

The mean height of the plants was measured during the course of the experiment. Different nitrogen regimes were supplied one day before inoculation (dpi): 0N (doted lines) and 1N (continued lines). A Mann and Whitney test was used to compare the 0N and 1N conditions; **$p<0.01$.



Supplemental Figure 3. Gene expression in Maratelli plants under different nitrogen regime

A. The Maratelli genotype (temperate japonica) was treated with the 0N or 1N solutions one day before inoculation with the GUY11 isolate. Gene expression was measured before inoculation (B) and 2 dpi (C). The actin gene was used to normalize the samples. The mean and sd from three biological replicates are shown. A Mann and Whitney test was used to compare the 0N and 1N conditions; *: $p<0.05$.

Fertilizer variable NO3/NH4								
			volume (mL) for 40 mL total (NO3/NH4)					
		stock solution	100-100	25-75	75-25	0-100	100-0	0N
Macronutrient (M)	K2SO4	0.34	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
	KH2PO4	0.49	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
	NH4NO3	0.50	2.0	1.0	1.0	0	0	0.0
	(NH4)2SO4	0.25	0.0	2.0	0.0	8	0.0	0.0
	Ca(NO3)2,4H2O	0.13	0.0	0.0	5.3	0.0	10.5	0.0
	MgSO4, 7H2O	0.77	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Micronutrient (mM)	H3BO3	0.456	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	MnSO4	0.252						
	(NH4)6Mo7O24,4H2O	0.004						
	CuSO4, 5H2O	0.039						
	ZnSO4, 7H2O	0.153						
	Ferveg (6%Fe)		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	H2O		13.0	12.0	8.7	7.0	4.5	10.0
	pH 5,5							

Fertilizer NO3/NH4=50/50					
			volume (mL) for 40 mL total (NO3/NH4)		
		stock	0N	1N	2N
Macronutrient (M)	K2SO4	0.34	8.0	8.0	8.0
	KH2PO4	0.49	8.0	8.0	8.0
	NH4NO3	0.50	0.0	2.0	4.0
	MgSO4, 7H2O	0.77	4.0	4.0	4.0
Micronutrient (mM)	H3BO3	0.456	4.0	4.0	4.0
	MnSO4	0.252			
	(NH4)6Mo7O24,4H2O	0.004			
	CuSO4, 5H2O	0.039			
	ZnSO4, 7H2O	0.153			
	Total		4.0	4.0	4.0
	Ferveg (6% Fe)		1.0	1.0	1.0
	H2O		11.0	9.0	7.0
	pH 5,5				

Supplemental Table 1: Protocol fertilization solution.

Primer sequences for qPCR experiments

gene	Annotation	Accession	Sequence Forward Primer	Sequence Revrse Primer
PR5	protein PR (pathogenesis related)	Os12g43430	CGCTGCCCCCGACGCTTAC	ACGACTTGGTAGTTGCTGTTGC
PBZ1	protein PR (pathogenesis related)	Os12g36880	CCTGCCGAATACGCCTAAGATG	AGAACACATTCAGACTTGCCTCTC
OsMT2b		Os05g02070	ACCGTCGTCGTCGTTGTCAG	GCATGAGGAGATGGAGCAGGAG
PAL		Os02g41650	TTCTTGATCGCCCTGTGCCAAG	TGCATCACGCAGTTCTTCACC
Glucanase	protein PR (pathogenesis related)	Os01g71340	CGTTCCATATATAGTTTGGGTTTG	TCAAGTTCATATTATTTGTCTCTG
Rbb1-2		Os01g03390	ATCTGTGTCCGTCAATAAAACTCG	TTGCTCTTGGTCACTGGCTAG
Subtilase	protein PR (pathogenesis related)	Os01g58290	CGGAAAGTTGCTGACCCATTCG	GCTCGCCGCACCTTGATTG
MAPK6		Os05g49140	GCCGTTCAATATGGTGTTTCAAG	GCCTTATATCTGGGTGGATGGG
PR3	protein PR (pathogenesis related)	Os04g41620	CGTGTCTGTGGAGAGCGTGGTC	TCGTCGTTGGTGCGGTCATTGG
BURP		Os05g12640	CGGCTGGCTATCATGTTATCATCG	AGTTGGTTTATTTCGGGACAGAGG
metallothionein	protein PR (pathogenesis related)	Os05g11320	TGACAAGAGCCAGTGCGTGAAG	TGCCGTCGTTCTCCTCGTAGC
Mg4	Elongation factor	MG03641	GCCCGGTATGGTCGTTACCT	AGCTGCTGGTGGTGCATCTC
Spm1	Protease	MG03670	ACGCCGACGCATGCAACTATTC	AGCCGAAGCACCAACAGTAACG
T4H	T4H reductase	MG07216	CCTCAACCTCAACACCAGGG	ATTCACTCTCCTCCTGGCAA
Mpg1	Hydrophobin	MG10315	GCTCATCCCCATCAACAACT	GTGCACTGGATTGACCAG

Supplemental Table 2: Primers used in this study.

3. Compléments première partie

Nous avons également testé lors de ce travail d'autres sources d'engrais (engrais retard) et différents substrats. Les protocoles utilisés sont ceux décrits dans l'article 1 sauf mention particulière ci-dessous.

3.1. Etude de l'effet des substrats neutres sur la sensibilité du riz à *Magnaporthe oryzae*

Afin de connaitre l'influence de l'azote dans la sensibilité de Magnaporthe oryzae sur le riz dans les substrats neutres, nous avait testé des substrats neutres tels que la perlite et la vermiculite. Durant cette étude on s'est proposé de comparer les plantes cultivées dans le substrat contenant de la perlite, de la vermiculite et dans du terreau normal. Nous avons appliqué la condition optimum obtenue dans les expériences précédentes sur terreau (1N à 1dbi et inoculation avec Guy11) (obtenu dans l'article 1). On a constaté que les plantes cultivées dans les deux substrats neutres sont beaucoup plus petites que celles cultivées dans du terreau (figure 21). De même la partie foliaire est plus jaunâtre. En plus, les symptômes sont les mêmes dans les deux conditions 1N et 0N à 1dbi dans le cas de la vermiculite. Ces résultats nous ont permis de conclure que les substrats neutres, tant la perlite comme la vermiculite, sont désavantageux pour le bon développement du riz. Nous n'avons donc pas retenu ce mode opératoire pour la suite.

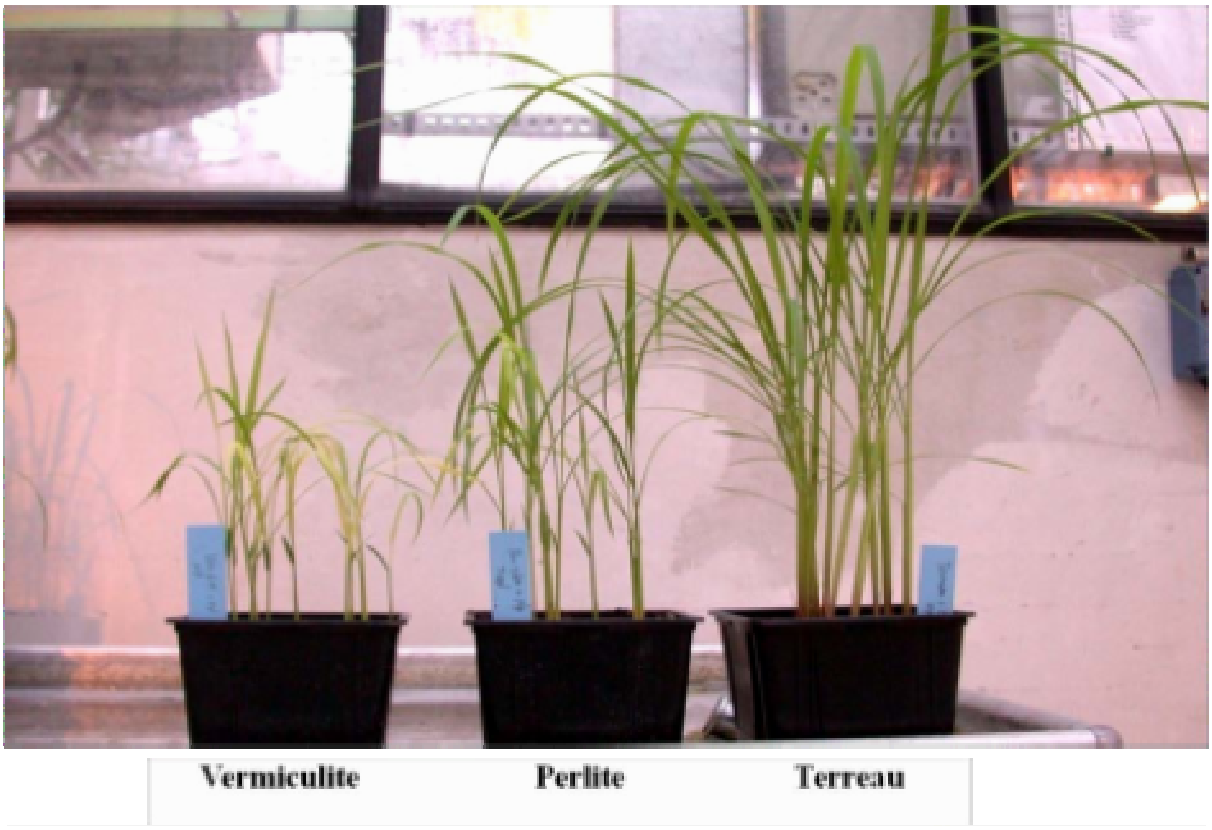


Figure 21: Plantes de la variété Kasalath dans trois types de terreaux différents après 1 mois

3.2. Test de l'effet de l'engrais retard sur la sensibilité du riz à *Magnaporthe oryzae*

3.2.1. Matériel et méthode

Afin de connaitre l'effet d'un relarguage d'azote progressif sur la sensibilité du riz à Magnaporthe oryzae, nous avons testé une fertilisation avec de l'engrais retard. Ce type d'apport est plus proche de ce qui se passe au champ. L'engrais retard Basacote plus 6M est composé de granulés NPK (11% N - 9% P2O5- 19 K2O). Tous les éléments sont entourés de polymère et lorsque l'eau pénètre dans les granulés, les éléments se solubilisent dans l'eau et forment une solution nutritive concentrée. L'enrobage assure une libération contrôlée et uniforme pendant 6 mois d'action du produit. Ces granulés ont été ajoutés au terreau au moment du semis.

La composition des granulés d'engrais retard est la suivante: Ammonium (NH4): 6.5%; Nitrate (NO3): 4.5%; Anhydride phosphorique (P2O5): 9%; Oxyde de potassium (K2O): 19% ; Oxyde de magnésium (MgO): 2% ; Anhydride sulfurique (SO3): 17.5% ; Bore (B): 0.02%; Cuivre (Cu) : 0.05%; Fer (total Fe) : 0.4%; Manganèse (Mn) : 0.06% ; Molybdène (Mo) : 0.015% ; Zinc (Zn) : 0.02%

Variétés utilisées: Nippobare, Kasalath
Souche de M. oryzae : Guy11
Fertilisation: Voir tableau 9

3.2.2. Résultat

Après avoir observé le développement des plantes qui ont subi les différents traitements, nous pouvons constater que les plantes en traitement 2 EG, 4 EG et 8 EG sont identiques entre elles et plus grandes que les plantes en traitement 1/4 EG et 1 EG (Figure 22). De plus, les feuilles en traitements 1/4 et 1 EG sont jaunes. Ceci indique que le traitement 1/4 et 1EG ne fournit pas suffisamment de nutriments pour les plantes. Cependant, nous avons constaté des différences significatives en comparant la taille des feuilles entre les différents traitements (tableau 10, figure 23). Tous ces éléments font que ce mode opératoire n'a pas pu être retenu pour des expériences ultérieures car il y avait trop de différence de développement des plantes entre les traitements.

	1/4 ER	1 ER	2 ER	4 ER	8 ER
Terreau Neuhaus S	1L	1 L	1L	1L	1L
Pouzzolane	30 mL	30 mL	30 mL	30mL	30mL
Engrais retard 6M	0,25 g	1,4 g	2.8 g	6g	12g

Tableau 9: Protocole de test de l'engrais retard

	Traitement engrais retard				
	1/4 ER	1 EG	2 EG	4 EG	8 EG
Croissance des plantes	feuilles jaunes	feuilles jaunes	normal	normal	normal
Sensibilité à M. oryzae	+	+	++	++++	+++

Tableau 10: Résultats de développement des plantes et de sensibilité à M. oryzae après différents apports en engrais retard au semis.

(+ : peu sensible ; ++ : moyennement sensible ; +++ : sensible; ++++ : très sensible).

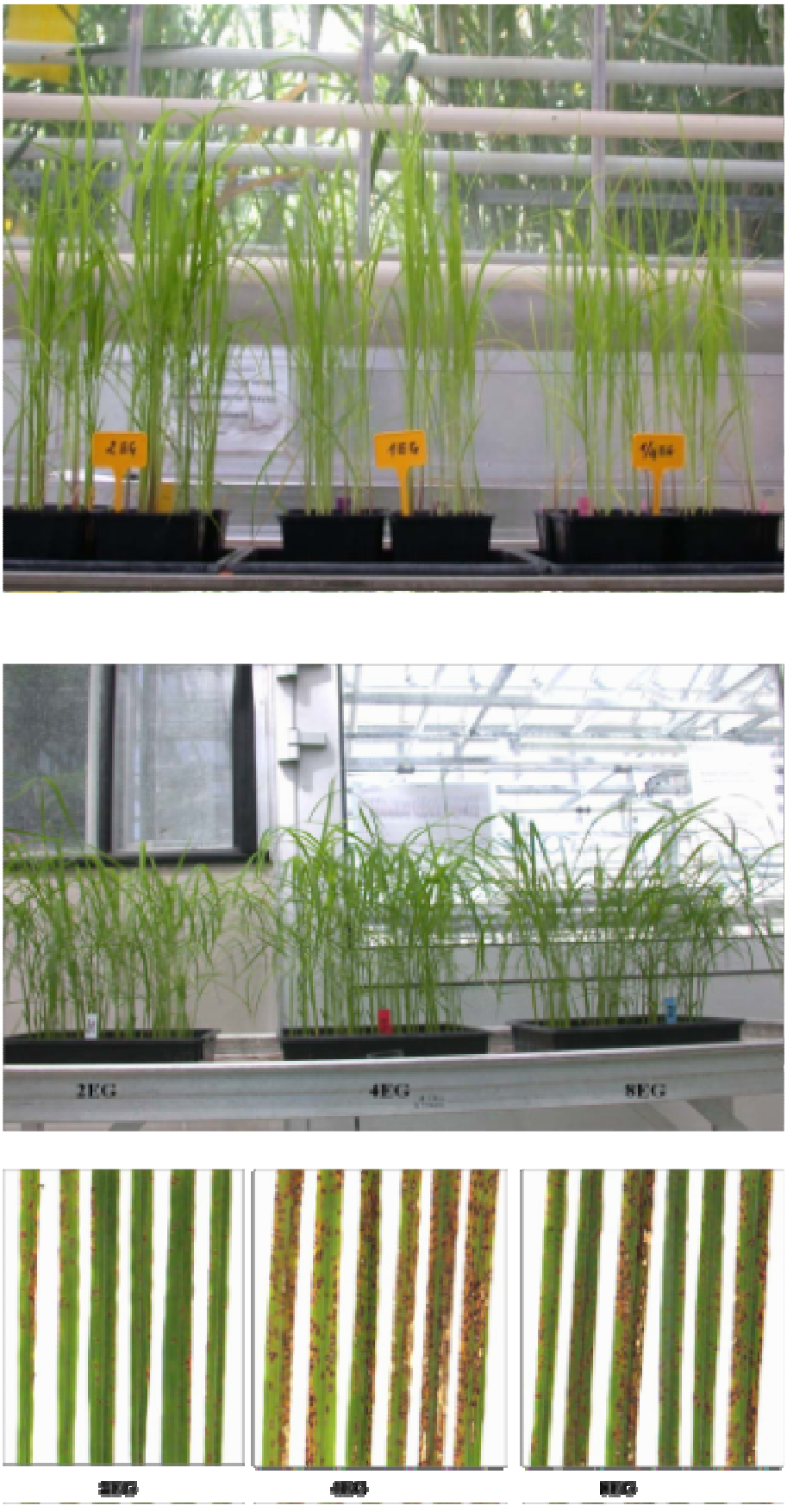


Figure 22: Haut et milieu: Plantes sous 3 traitements d'engrais retard ; Bas : Symptômes des plantes inoculées avec Guy11 sous les 3 conditions d'engrais retard.

DEUXIEME PARTIE : Diversité et génétique de la sensibilité induite par la fertilisation azotée

1. Introduction

Dans cette partie du travail, nous avons choisi de mesurer l'effet de la fertilisation azotée sur 14 cultivars afin de savoir si l'effet de la fertilisation azotée était fréquent chez le riz et si les réponses phénotypiques étaient similaires. Ces cultivars ont été choisis car le niveau de résistance partielle de ces variétés a déjà été caractérisé par l'équipe précédemment (Vergne et al. 2010). Ensuite, des tests de résistance de variétés possédant un gène résistance connu (Pia, Pi1, Pi2) en présence d'azote ont été réalisés dans le but de connaître l'effet de l'azote sur les gènes de résistance à la pyriculariose. En plus, nous avons choisi de réaliser une détection des zones du génome du riz qui sont importantes pour un maintien de la résistance en présence d'apports azotés à l'aide d'une population CSSL issue d'un croisement entre les génotypes de riz Nipponbare et Kasalath. Les principes liés à ce type de cartographie sont indiqués ci-dessous.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

Lors de la mise au point du protocole de NIS nous avons pu identifier que les variétés Nipponbare et Kasalath ne présentaient pas le même phénotype en présence d'azote (voir première partie). Nipponbare a une résistance robuste alors que Kasalath a une résistance partielle qui diminue en présence d'azote. Afin d'identifier une zone du génome du riz qui contrôle ce phénotype nous avons utilisé une population de type CSSL (Chromosomal Segment Substitution Lines). Les lignées CSSL sont issues d'un croisement Nipponbare x Kasalath, qui ont été plusieurs fois retro-croisées (Li et al. 2011; Ye et al. 2010). Dans l'idéal le génome est constitué d'un fond génétique unique receveur (Nipponbare), dans lequel seul un segment de chromosome, c'est-à-dire une seule introgression, appartient au génotype donneur (Kasalath). Ce caractère unique de l'introgression du génotype donneur dans une ligne de la population permet d'accéder directement à la zone du génome qui contient le QTL (figure 24). La population CSSL Nipponbare x Kasalath contient 54 lignées.

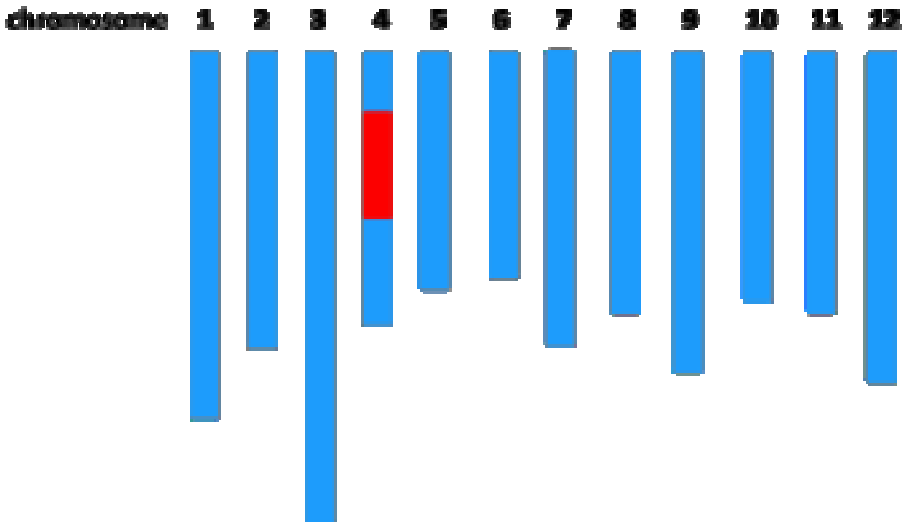


Figure 23: Carte génétique schématique d'un exemple de lignée CSSL idéale du riz. Les parties des douze chromosomes du riz provenant du cultivar receveur sont en bleu et celle en rouge correspond au cultivar donneur.

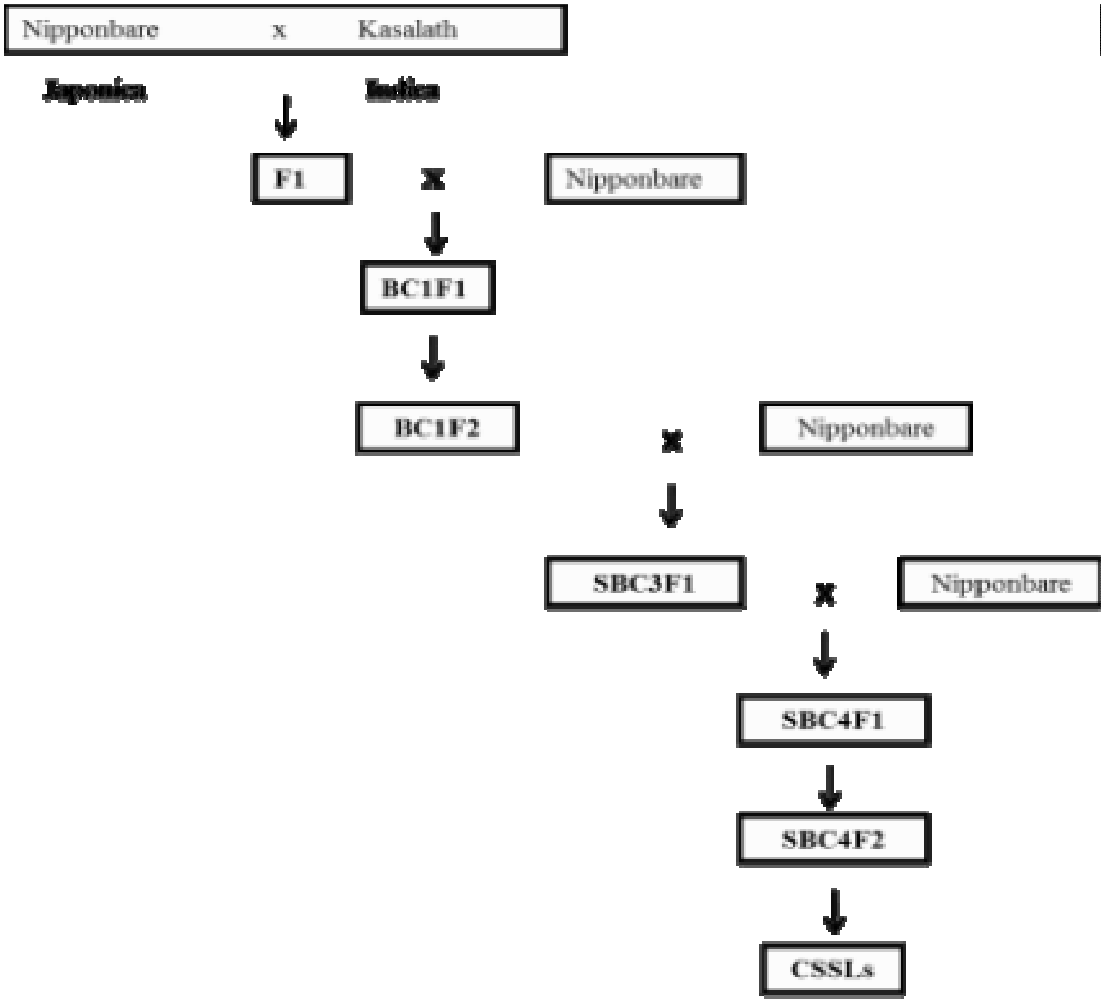


Figure 24: Schéma de construction de lignes de substitution de segments chromosomiques (CSSLs) de la population Nipponbare et Kasalath du génome du riz.

2.2. Phénotypage

Les 54 lignées de la population Nipponbare et Kasalath ont été testées dans la condition optimum d'apport azoté afin d'identifier les lignées présentant une NIS à Magnaporthe oryzae. Trois isolats Guy11, FR13, JP10 ont été utilisés dans ces expériences. Pour ce faire, nous avons testé la population CSSL avec la souche Guy11 (4 fois), FR13 (1 fois) et CL32 (1 fois) avec le protocole décrit dans la première partie. Une analyse phénotypique des plantes CSSLs a été réalisée en utilisant la méthode de comptage des lésions sur les feuilles grâce au logiciel image J.

2.3. Croisements

Afin de valider et d'affiner les régions QTL qui provoquent le phénotype de sensibilité accrue à M. oryzae en présence d'azote, nous avons croisé certaines des lignées avec le parent récurent Nipponbare. Une partie des 54 lignées de la population CSSLs Nipponbare x Kasalath ont été ainsi croisées par anticipation pour obtenir des plantes F1 et F2. Au total 74 croisements ont été réalisés et 29 F1 récoltées.

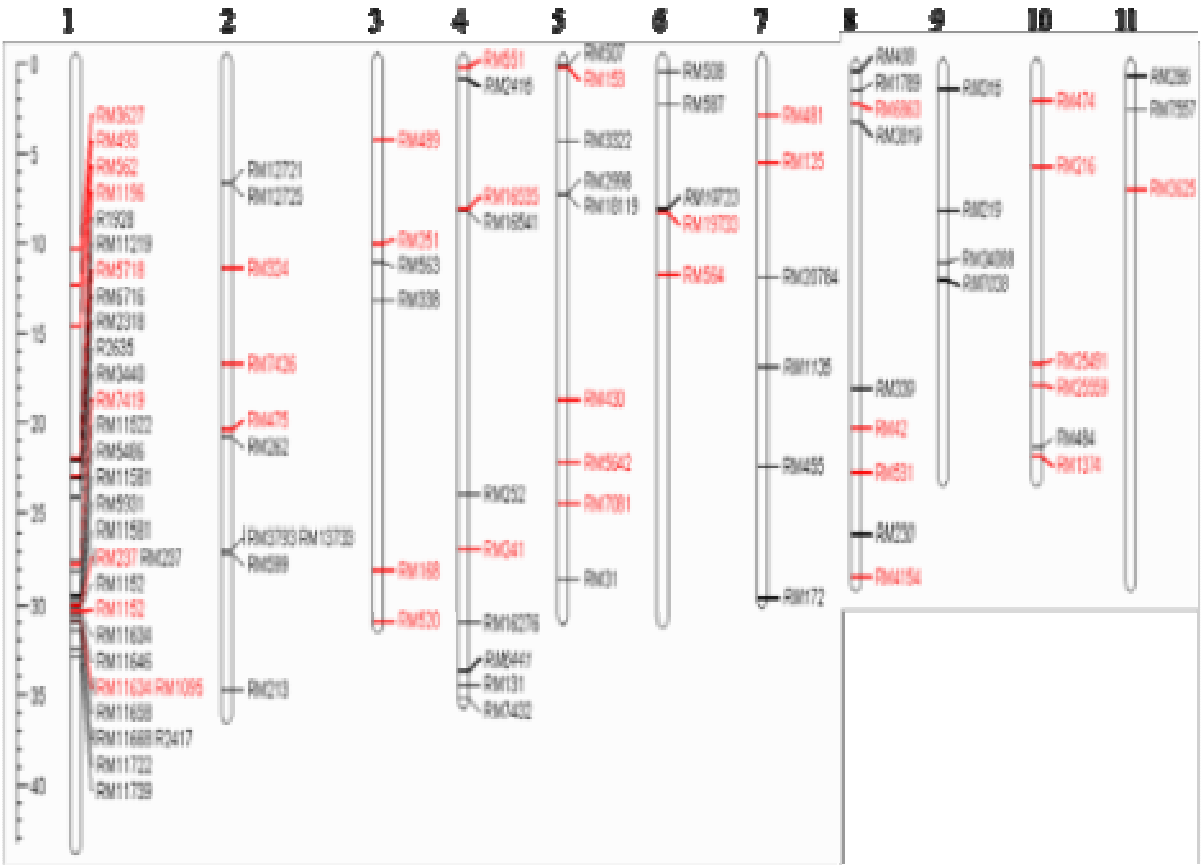


Figure 25: Marqueurs microsatellites utilisés pour la cartographie de la population CSSLs Nipponbare x Kasalath

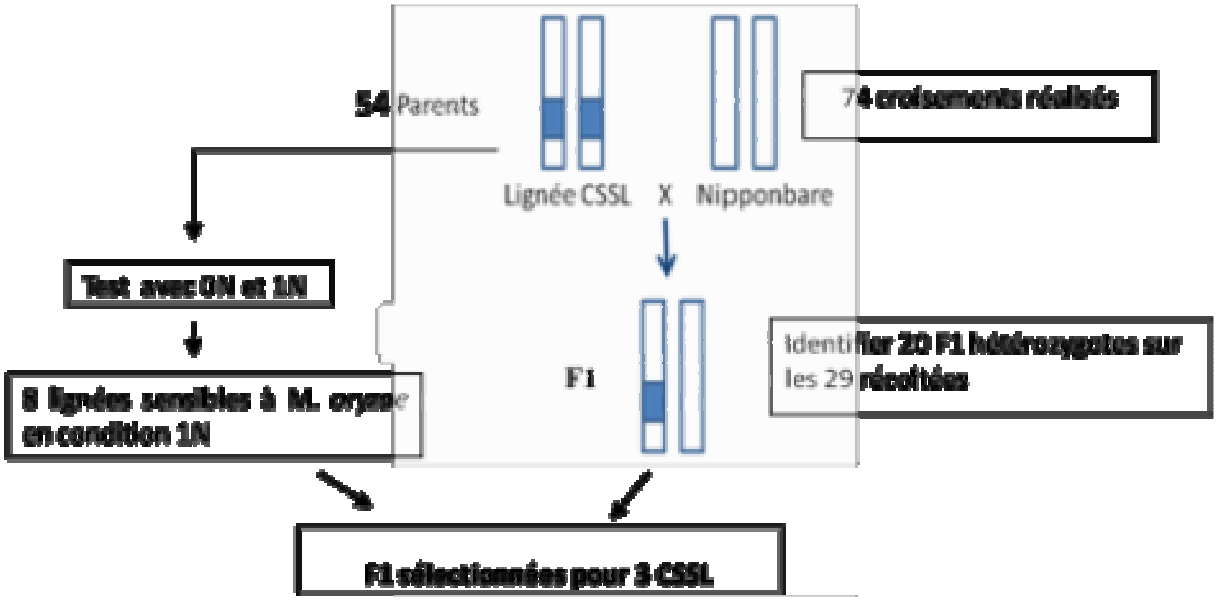


Figure 26: Bilan des croissements pour faire la cartographie QTL

3. Analyse moléculaire des plantes F1

Afin de détecter les F1 qui sont hétérozygotes ou homozygotes (autofécondation donc inutiles), nous avons utilisé des marqueurs microsatellites. Pour cela, nous avons dû identifier au préalable 95 marqueurs microsatellites pour cette population CSSLs ; ensuite nous avons réalisé l'optimisation de ces marqueurs afin de choisir les marqueurs polymorphes. Au total 65 marqueurs ont été sélectionnés en fonction de leurs polymorphismes pour la population CSSLs (figure 26).

D'après les génotypage, 20 F1 étaient hétérozygotes sur les 29 récoltées.

Nous avons obtenus des F1 hétérozygotes pour trois lignées d'intérêt sur les 8 lignées identifiées comme présentant une NIS: SL4, SL5, SL19. Les F1 de ces trois lignées ont été maintenues jusqu'en F4 pour pouvoir être phénotypées pour leur sensibilité à M. oryzae dans différentes conditions de fertilisation.

Les résultats des phénotypes et génotypes obtenus pour les 54 lignées CSSL et pour les descendants sont présentés dans la publication 2.

4. Introduction et résumé de l'article 2

Le phénomène de NIS a pu être observé dans des conditions contrôlées (Article 1), ce qui nous a permis d'effectuer des analyses de génétique et de diversité de ce phénomène. Dans cette étude, nous avons examiné un effet de l'azote à la sensibilité à la pyriculariose pour le riz et le blé. Ces analyses montrent que la NIS à Magnaporthe est un phénomène général affectant la résistance de ce champignon dans ces deux céréales.

Afin de traiter la question du polymorphisme de la NIS à travers la diversité du riz, un panel de variétés a été testé pour la NIS. Nous avons pu montrer que la NIS est très polymorphe et n'est pas corrélée avec la différence liée aux sous-groupes indica / japonica du riz. Nous avons également testé la robustesse de trois différents gènes majeurs de résistance (Pia, Pi1 et Pi2) en présence d'azote. L'azote a partiellement réduit la résistance déclenchée par le gène Pi1. L'examen cytologique montre que le taux de pénétration n'est pas affecté par le régime riche en azote, alors que la croissance du champignon est augmentée à l'intérieur de la cellule. En plus, la comparaison de l'expression de plusieurs gènes défense du riz dans différentes conditions d'azote nous a permis de montrer que l'expression de certain gènes augmentent en présent d'azote à 2 jours et 4 jours après inoculation.

Les travaux de Talukder et al (2005) ont montré l'intérêt des approches de recherche de QTLs de résistance dans différentes conditions de fertilisation azotée. Dans cet article, nous avons identifié une zone du génome qui contrôle la sensibilité du riz à la pyriculariose par l'utilisation de la population de cartographie CSSL entre Nippobare et Kasalath. Nous avons identifié un locus sur le chromosome 1 de Kasalath, appelé NIS1, qui augmente la sensibilité de façon dominante en présence d'azote.

5. Article 2: Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat

Running tittle: diversity of nitrogen-induced blast susceptibility

Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat

Elsa BALLINI[1*], Thuy Thi Thu NGUYEN[1*] and Jean-Benoit MOREL[2]

*: contributed equally to this work

[1]SupAgro, UMR BGPI INRA/CIRAD/SupAgro, Campus International de Baillarguet, TA A 54/K, 34398 Montpellier, France

[2]INRA, UMR BGPI INRA/CIRAD/SupAgro, Campus International de Baillarguet, TA A 54/K, 34398 Montpellier, France

Corresponding author:

jbmorel@cirad.fr, Phone +33499624838, Fax +33499624822

INRA, UMR BGPI INRA/CIRAD/SupAgro, Campus International de Baillarguet, TA A 54/K, 34398 Montpellier, France

ABSTRACT

Nitrogen often increases disease susceptibility, a phenomenon that can be observed under controlled conditions and called NIS, for Nitrogen-Induced Susceptibility. In this study, we examined the extent of NIS in rice and in wheat susceptibility towards the blast fungus, Magnaporthe oryzae. Our data indicate that NIS is a general phenomenon affecting resistance to blast fungus in these two cereals. We also used our experimental system that does not strongly affect plant development to address the question of NIS polymorphism across rice diversity. We show that the capacity of rice to display NIS is highly polymorphic and does not correlate with difference related to indica/japonica sub-groups. We also tested the robustness of three different major resistance genes under high nitrogen. Nitrogen partially breaks down resistance triggered by the Pi1 gene. Cytological examination indicates that penetration rate is not affected by high nitrogen whereas growth of the fungus is increased inside the plant. Using the CSSL mapping population between Nipponbare and Kasalath, we identified a Kasalath locus on chromosome 1, called NIS1, which dominantly increases susceptibility under high nitrogen. We discuss the possible relationships between Nitrogen Use Efficiency (NUE), disease resistance regulation and NIS. This work provides evidences that robust forms of partial resistance exist across diversity and can be genetically mapped. This work also suggests that under certain environmental circumstances, complete resistance may breakdown, irrelevantly of the capacity of the fungus to mutate. These aspects should be considered while breeding for robust forms of resistance to blast disease.

Keywords: rice, wheat, Magnaporthe oryzae, nitrogen, NUE

INTRODUCTION

Plant disease resistance is often affected by high nitrogen supply. More generally, the effects of high nitrogen on plant disease are depending on the plant-host combination (Dordas 2008). For instance, it is commonly observed that high nitrogen enhances susceptibility to biotrophic and hemibiotrophic pathogens while it reduces it in the case of necrotrophic pathogens. However in some cases, the growth of pathogens that are considered as hemibiotrophic is reduced under high nitrogen. This is the case of the interaction between wheat and Fusarium graminearum (Yang et al. 2010).

In the case of rice blast disease caused by the Magnaporthe oryzae fungus, early reports mention this phenomenon as « Koe-imochi » (Bonman 1992; Otani 1959; Ou 1972; Tanaka 1961). The molecular and cytological mechanisms of this phenomenon that we call Nitrogen-Induced Susceptibility (NIS) are far from being understood. In a companion paper (Nguyen et al, this issue), we provide evidence that a trophic relationship impacting on fungal pathogenicity may be causal of NIS in rice. Here we show that NIS also exists in the case of the wheat blast disease and we explore the genetic diversity and determinism of NIS in rice.

To defend themselves against pathogen attacks, plants have developed defense systems that are articulated in three major steps: recognition by different types of receptors, signal transduction and finally induction of the defense arsenal including for example the Pathogenesis-Related (PR) genes (Jones and Dangl 2006). When a particular motif from the pathogen is recognized by such a plant receptor, the plant efficiently triggers inducible systems that lead to resistance. In that situation, the interaction is called incompatible, the resistance is complete, the receptor is defined as a resistance (R) gene and the pathogen is avirulent. This type of resistance is associated with the development of the so-called Hypersensitive-response (HR) that is often manifested by visible necrotic lesions (later called resistant lesions). Breeders have long been using this type of R genes in their breeding schemes; indeed R genes are usually dominant and they confer strong levels of resistance. However, the drawback of such genes is that they are often not durable because pathogens can evolve to by-pass recognition by the R genes (Correa-Vitoria and Zeigler 1994; Boyd et al. 2013). To our knowledge, the efficiency of R genes under high nitrogen has not been studied.

Breeders have also been using another form of resistance called partial or quantitative resistance. A partial resistance genotype allows limited but significantly reduced pathogen reproduction when compared with a susceptible genotype (Parlevliet and van Ommeren

1975). Partial resistance, while conferring lower levels of resistance, is usually considered as broad-spectrum, although this assumption is not always based on the observation (Ballini et al. 2008b). Lesion density and diseased surface are often considered as the major traits defining partial resistance (Talukder et al. 2005a; Roumen 1994). Whereas lesion density usually reflects the success of penetration of the pathogen, the diseased surface is mostly conditioned by the capacity of the pathogen to progress inside the plant tissues. In the field, partial resistance to rice blast was shown to be inefficient under high nitrogen (Prabhu et al. 1996) whereas Talukder et al. (2005a) observed under controlled conditions that partial resistance is not strongly affected. Thus there is yet no consensus on the extent of NIS in the case of partial resistance to blast disease. Furthermore, there has been no examination of NIS across a representative rice diversity panel.

There is only one report on the genetic analysis of the effect of nitrogen on blast resistance (Talukder et al. 2005a). In this work the authors analyzed a recombinant population between the Azucena and Bala genotypes. They found three loci conferring partial resistance only under low nitrogen input. In contrast, four partial resistance loci were robust under high nitrogen and one was only observed under high nitrogen. The genetic maps produced were not detailed enough to allow speculations on the genes potentially responsible for the phenotypes observed. Our knowledge on the genetic control of NIS is thus very limited and identifying loci responsible for this effect should shed some light on this phenomenon.

In this work, we addressed these questions related to the diversity and genetic control of NIS in rice. Using our protocol of nitrogen-induced susceptibility (Nguyen et al, this issue), we tested whether the observation of this phenomenon could also be extended to another cereal, wheat, that is attacked by the blast fungus M. oryzae. Using this disease as a model, NIS was measured in a panel of representative rice cultivars and in wheat. We also evaluated the robustness of known resistance genes under high nitrogen and analyzed how disease resistance was triggered at the molecular level in these conditions. Furthermore, we initiated a genetic mapping of NIS in rice to identify loci that are important for the control of this phenomenon.

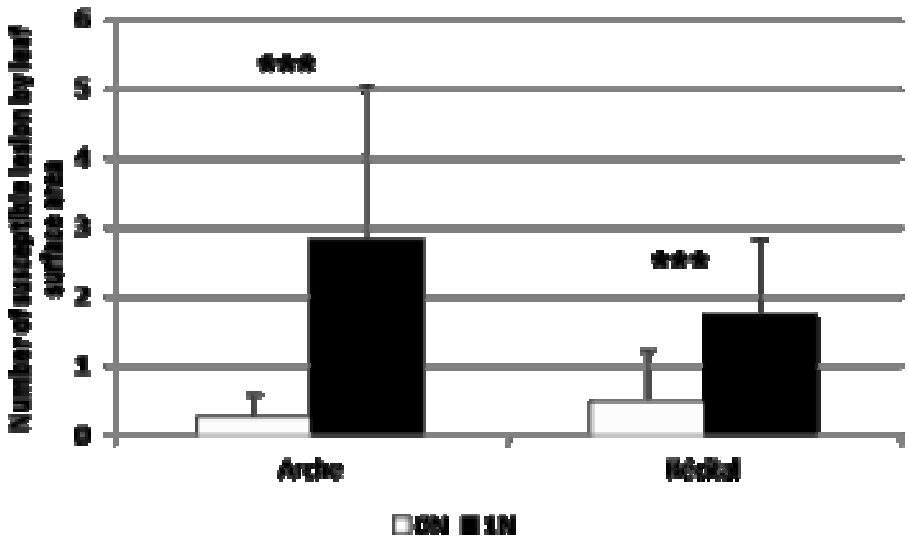


Figure 1. Nitrogen-induced susceptibility to wheat blast

Nitrogen (black bars; 1N) or no nitrogen (white bars; 0N) was added to wheat plants one day before inoculation with the BR32 isolate of M. oryzae (see Methods). Lesions were counted 7 days post-inoculation. ***: p value<0.001 (Wilcoxon test).

RESULTS

Nitrogen-induced susceptibility and wheat blast disease

Wheat blast disease, caused by isolates of Magnaporthe oryzae specialized on wheat has become a major threat in Southern America (Debona et al. 2012; Kohli et al. 2011). Nitrogen enhances susceptibility in a simplified system involving rice and M. oryzae (Nguyen et al, this issue). The effect of high nitrogen on the impact of wheat blast has not been evaluated thus far. We further tested whether this phenomenon could be extended to wheat blast disease. Two wheat cultivars, Arche and Récital, were tested with the M. oryzae BR32 isolate which is aggressive on wheat (Figure 1). The two lines tested were more susceptible to the wheat blast isolate BR32 under high nitrogen supply. Similar results were observed with another isolate (data not shown). The nitrogen-induced susceptibility to wheat blast was higher in the Arche cultivar than in the Récital cultivar. Thus NIS can also be observed in the case of wheat blast.

Nitrogen-induced susceptibility across rice diversity

The same fungal disease caused by M. oryzae was affected by nitrogen in two cereals, wheat (Figure 1) and rice (Nguyen et al, this issue). We next tested intra-specific diversity of this phenomenon in rice. We thus evaluated the level of polymorphism of NIS across rice diversity. This evaluation is critical for both the identification of robust forms of disease resistance as well as for the identification of loci important for robustness. We used a set of 14 lines representative of rice diversity and well-characterized for their quantitative levels of resistance towards M. oryzae (Vergne et al. 2010). This represents 7 indica and 7 japonica types (Suppl Table 1) that were grown under similar nitrogen regimes until the fourth leave had emerged. One day before inoculation, high or low nitrogen inputs were added (see Methods). Partial resistance is manifested by two major types of lesions (Roumen 1994) (see arrows in Figure 2B): grayish lesions, in the center of which the fungus sporulates (susceptible lesion) and small brown lesions indicative of successful resistance reaction (resistant lesion). Symptoms were noted and both types of lesions were counted (Figure 2) seven days after inoculation with the GUY11 isolate. A first group of seven cultivars (Padi Boenor, Kasalath, Popot 165, Chuan 4, Azucena, Maratelli and Ta Mao Tao) showed increased susceptibility to M. oryzae upon nitrogen supply (Figure 2A) with the least robust genotype being Padi Boenor. Two sub-classes of phenotypes could be further distinguished in this group: the Azucena, Maratelli and Tao Mao Tao cultivars only showed a significant

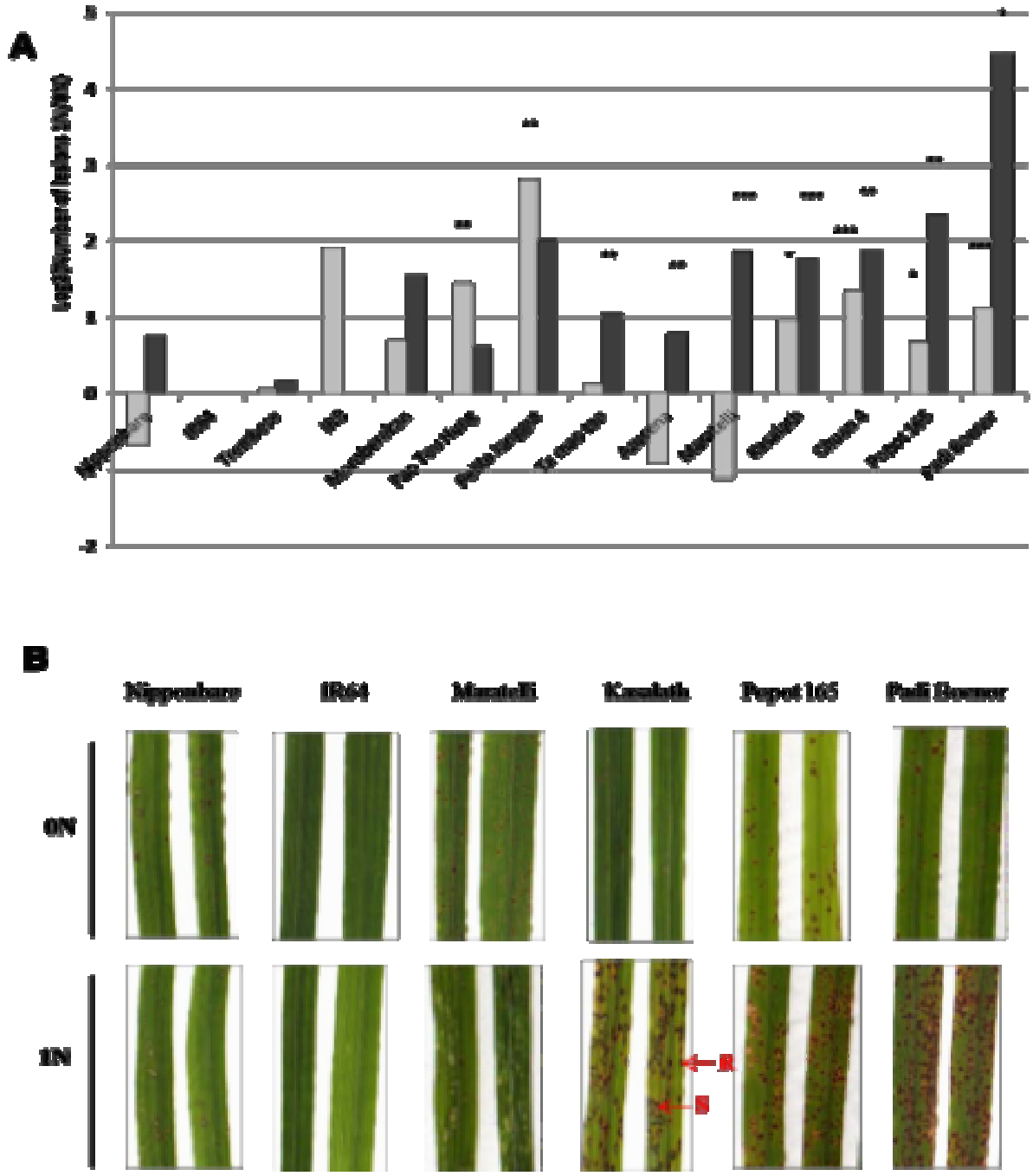


Figure 2. Diversity of nitrogen-induced susceptibility in rice

Nitrogen (1N) or no nitrogen (0N) was added to rice plants one day before inoculation with the GUY11 isolate of M. oryzae (see Methods). A. Different types (shown in B) of lesions typical of partial resistance were counted 7 days post-inoculation (dpi): lesions typical of resistance (light grey bars) and lesions typical of susceptibility (dark grey bars). The mean of each category of lesion was compared between the 0N and 1N condition and statistical differences are shown by *** (p value<0.001; Wilcoxon test). B. Examples of nitrogen-induced susceptibility at 7 dpi. Lesions typical of resistance (R) and lesions typical of susceptibility (S) are shown.

increase of susceptible lesions while the other cultivars showed an increase of susceptible lesions but also resistant ones (see below). Because both indica and japonica types are found in this group of cultivars displaying NIS, this genetic difference does not seem to be responsible for the observed differences in robustness to nitrogen-induced susceptibility. The breakdown of partial resistance was also observed with three other M. oryzae isolates (Suppl Table 1), suggesting that this nitrogen-induced susceptibility is not isolate specific and affects about half of our diversity panel.

A second group of seven cultivars (IR64, IR8, Moroberekan, Nipponbare, Trembese and Pao Tu Hung and Pelita Janggut) showed robust resistance to M. oryzae. Two cultivars (Pao Tou Hung and Pelita Janggut) showed a significant increase in resistant lesions but overall the plants remained resistant. In most cases, the cultivars tested showed high starting levels of resistance, which is hypothesized to result from a combination of major resistance genes and high partial resistance level (Wang et al. 1994a; Roumen 1994). Thus it is possible to find genotypes that display robust resistance levels even under high nitrogen supply. This confirms similar results observed previously in the field (Long et al. 2000a).

Nitrogen supply and major resistance genes

The increased number of the resistant lesions in some rice lines (Figure 2) upon high nitrogen supply prompted us to evaluate whether the triggering of resistance by known major resistance (R) genes could be affected. For that purpose we tested three R genes: Co39/Pia (Chauhan et al. 2002; Okuyama et al. 2011), Pi1 (Hua et al. 2012b) and Pi2 (Zhou et al. 2006). The Co39 and Pia genes are allelic, code for a duplex of NBS-LRR proteins and are revealed in the interaction between cultivar CO39 and the GUY11 transgenic isolate expressing the AvrCo39 avirulence gene (Cesari et al. 2013). The Pi2 (revealed in the interaction between C101A51 line and CL367 isolate; Telebanco-Yanoria et al. 2011) gene codes for an NBS-LRR paralogue of the Pi9 loci (Zhou et al. 2006). The Pi1 gene (involved in the interaction between the cultivar C104Lac and the isolate CL367, (Telebanco-Yanoria et al. 2011) codes for an NBS-LRR (Hua et al. 2012b). The Co39/Pia and Pi2 genes triggered resistant lesions to the same level irrelevantly of the nitrogen treatment (Figure 3A and 3B). Thus there are major resistance genes that do not seem to be affected by nitrogen supply.

In contrast, the number of resistant lesions triggered by the Pi1 gene significantly increased under high nitrogen regime as shown in the C104Lac line (Figure 3A and 3B). We

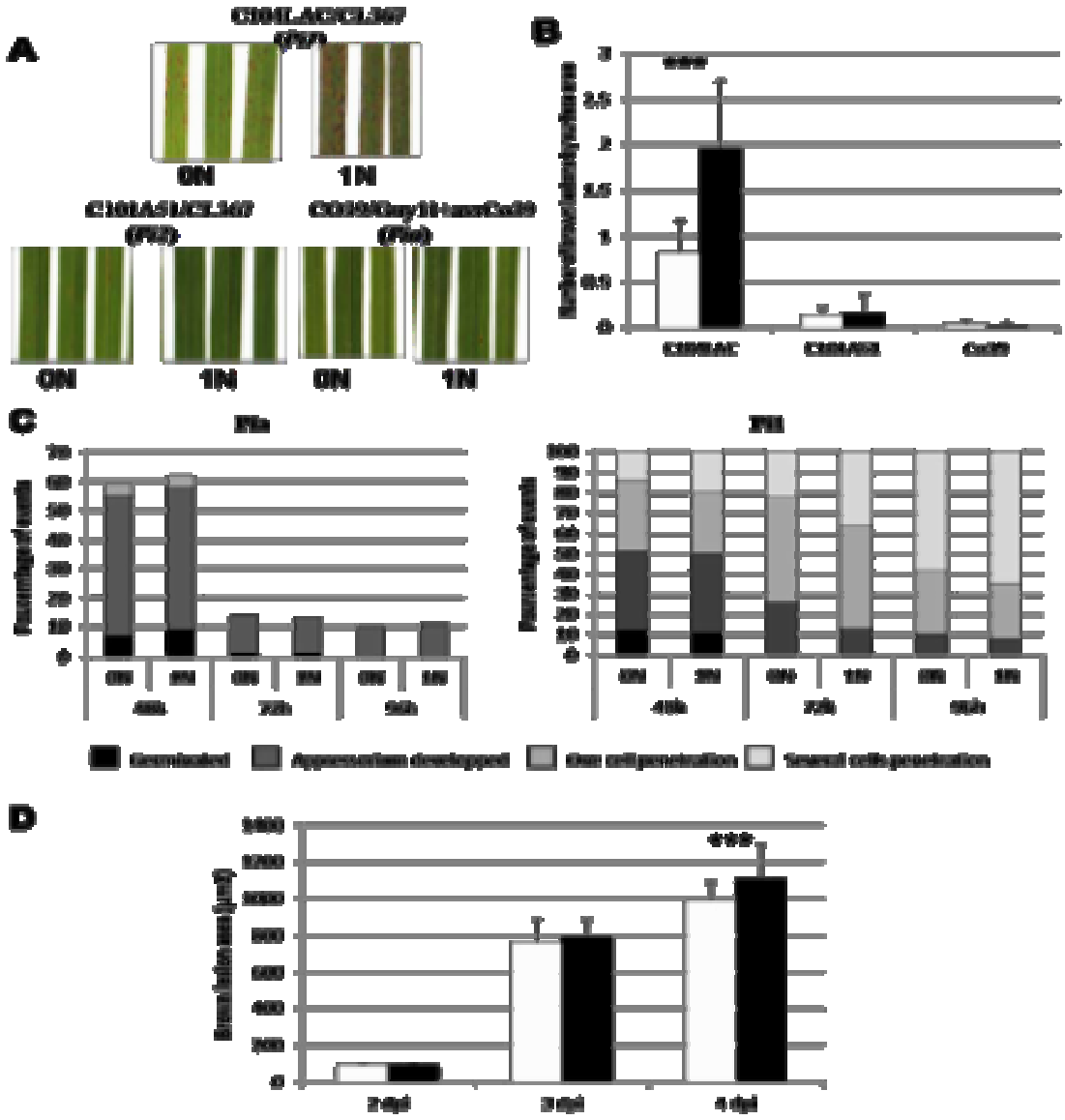


Figure 3. Robustness of resistance genes under high nitrogen treatment

Nitrogen (1N) or no nitrogen (0N) was added to rice plants one day before inoculation (see Methods). A. Different resistance genes (Pi1, Pi2 and Co39/Pia) were tested using different combinations of rice cultivars and M. oryzae isolates. B. The number of lesions typical of resistance was counted. There were no susceptible lesions under these conditions (white bars: 0N; black bars: 1N). The mean of the number of resistant lesions were compared between the 0N and 1N conditions and statistical differences are shown by *** (p value<0.001; Wilcoxon test). C. At the indicated time points after inoculation, the development stage of the fungus was observed and four categories of growth stages were counted 100 interaction sites/condition). This experiment was repeated 3 times and gave similar results. D. The average size of individual fungal colonies was measured inside plant tissues. The mean and sd are shown 50 colonies counted for each condition; white bars: 0N and black bars: 1N). Statistical differences are shown by *** (p value<0.001; Wilcoxon test).

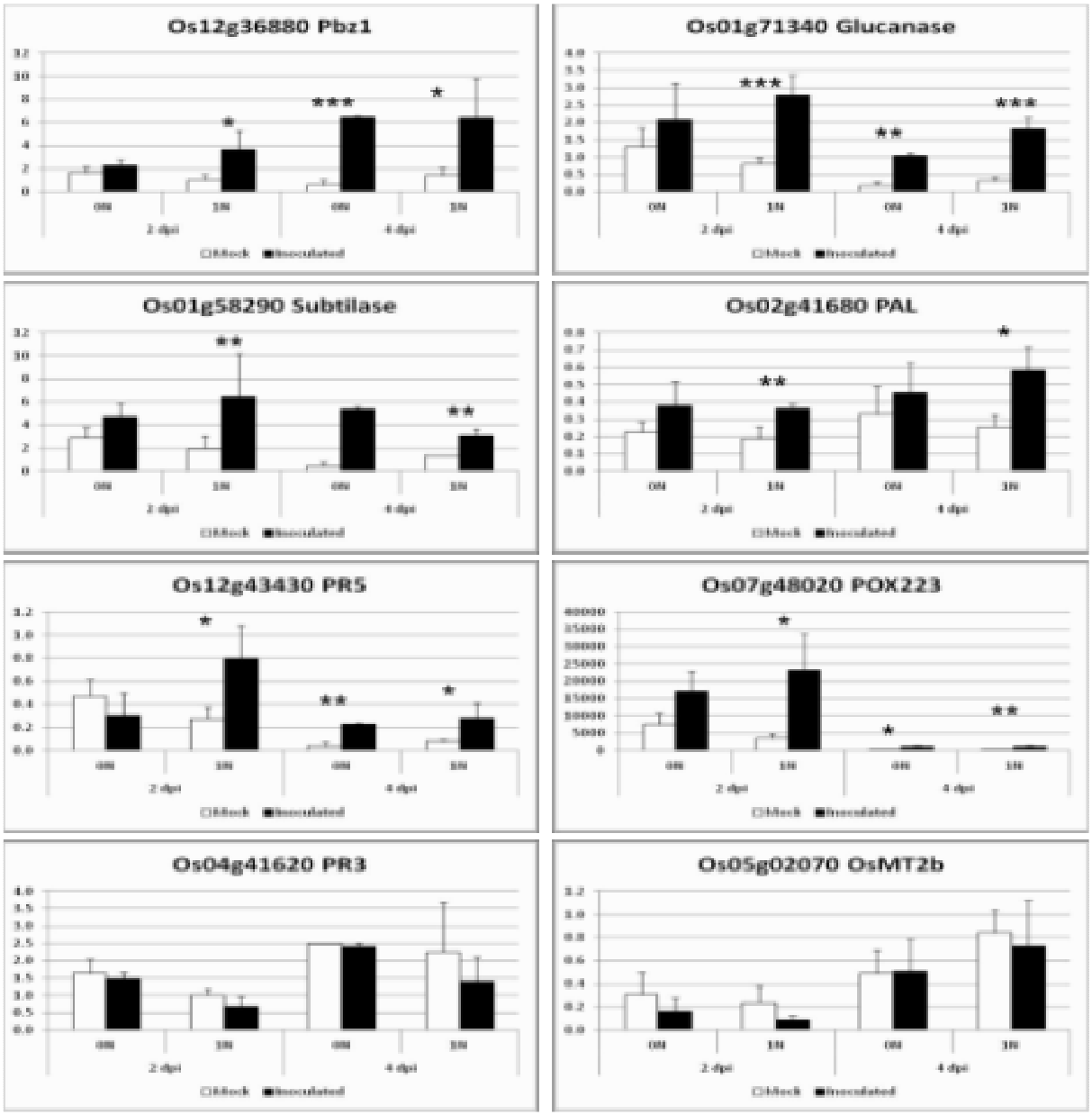


Figure 4. Defense gene expression triggered by the Pi1resistance gene under nitrogen treatment.

Rice plants of the C104Lac genotype (containing the Pi1 resistance gene recognizing the avirulent isolate of M. oryzae CL367) were grown under the same conditions except one day before inoculation where they were either treated with no additional nitrogen (0N) or additional nitrogen (1N). Uninfected plants (white bars: Mock) were used as controls to compare to infected plants (black bars). The expression of defense-related marker genes (normalized with the actin gene; arbitrary units are given; see Nguyen et al, this issue) was measured at the indicated time points after infection (2 and 4 days post inoculation-dpi). The mean and sd of three independent replicates are shown. The statistical differences between mock and inoculated plants are shown (Wilcoxon tests; *: $p<0.05$; **$p<0.01$; ***: $p<0.001$).

hypothesized that the breakdown of resistance triggered by high nitrogen supply increased the number of plant cells exposed to the fungus and that consequently the setting of defense reactions in an increased number of cells could lead to an increase of visible necrosis. Whether this temporary breakdown of R gene-triggered resistance occurs before or after penetration was tested. We measured at the cellular level the growth of M. oryzae in the contrasted cases of Pi1 and Co39/Pia. In the case of the Pi1 gene, we observed no difference in penetration at 48 hours post inoculation (hpi) between high and low nitrogen regime (Figure3C). Thus a modification of the penetration rate is unlikely responsible for the observed increase in resistant lesions. After penetration, there was a transient and slight increase in growth of the fungus at 72 hpi (Figure 3C). We further measured the growth of individual colonies (Figure 3D). At 96 hpi the average size of M. oryzae colonies was significantly higher under high nitrogen than under low nitrogen supply. Altogether, these data suggest that at least temporarily, the growth of the fungus inside the plant is not as halted by Pi1 under high nitrogen than it is under low nitrogen input.

We next evaluated whether enhanced defense response could be associated with the increase of resistant lesion upon nitrogen stress. The expression of 8 classical defense genes (Delteil et al. 2012) was measured to see how high nitrogen affects the triggering of defense by the Pi1 resistance gene. Except for the OsMT2b and PR3 genes that were not differentially expressed, and for the subtilase that is induced in both treatment, the five remaining genes were all induced earlier and/or stronger under high nitrogen (Figure 4). This suggests that defense systems are strongly induced by the Pi1 gene under high nitrogen supply.

Genetic analysis of nitrogen-induced susceptibility

As a first step towards identifying genetic components responsible for nitrogen-induced susceptibility, we initiated a genetic analysis using a Chromosomal Segment Substitution Lines (CSSL) from a cross between Nipponbare and Kasalath. These two parents were chosen as they are polymorphic for their response to M. oryzae under nitrogen pressure (Figure 1; Nguyen et al, this issue). These CSSL lines have been previously used to decipher complex traits (Wan et al. 2006). Because the recurrent parent of this population is Nipponbare, the expectation is that the majority of the lines should display robust partial resistance under high nitrogen. Conversely, the lines where a Nipponbare chromosomal segment has been replaced by an hypothetically non-functional allele from Kasalath are expected to display the Kasalath

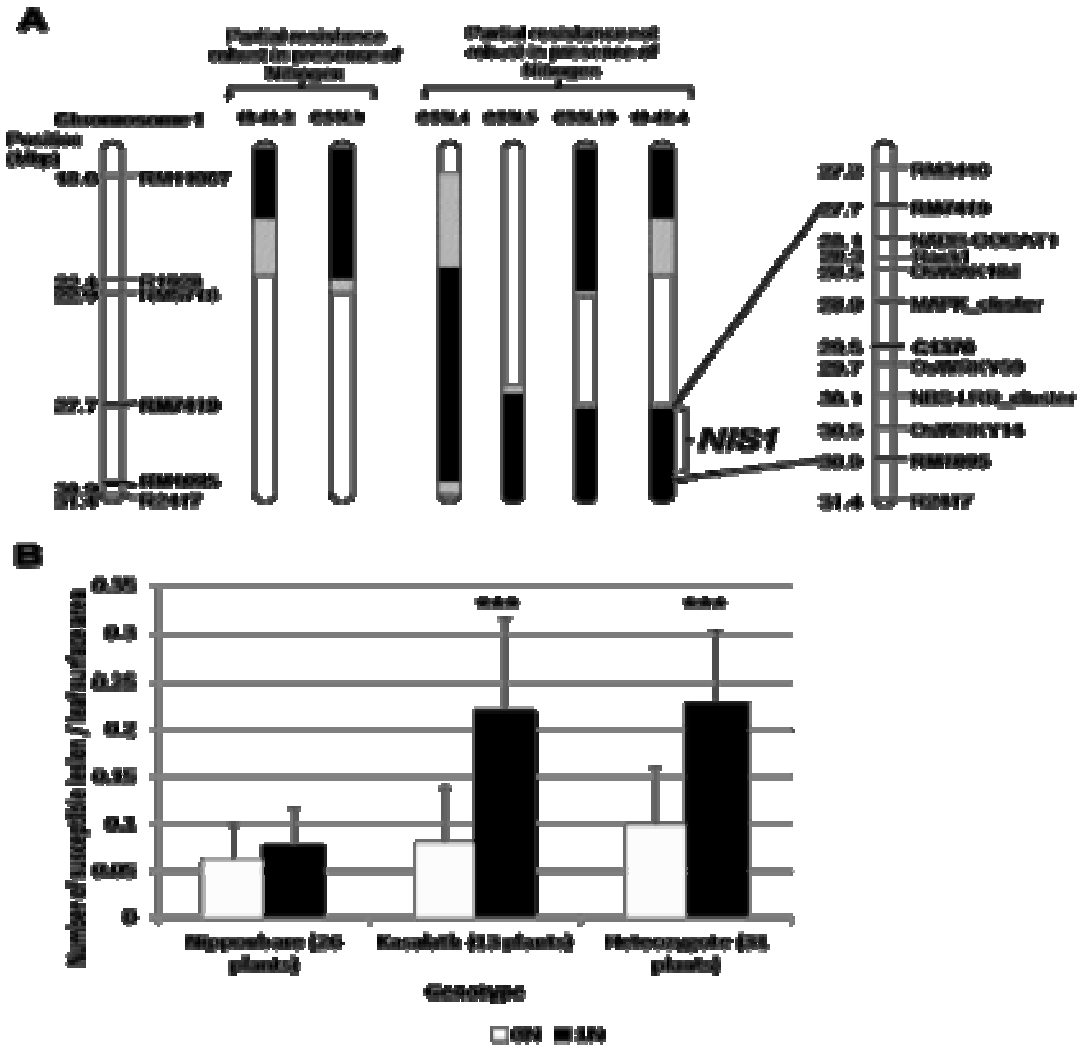


Figure 5. Mapping of a locus required for resistance under high nitrogen

The Nipponbare X Kasalath CSSL mapping population was scored for NIS to the GUY11 isolate (see Methods). A. The CSSL5, CSSL19 lines and two recombinant lines (19-42-2 and 19-42-4) identify chromosome 1 as carrying a Kasalath locus conferring susceptibility under high nitrogen treatment. The portions of the chromosome in black, white and dashed respectively correspond to Kasalath, Nipponbare and heterozygous as established by microsatellites markers (RM markers indicated on the left of the figure). Possible regulators of disease resistance and nitrogen metabolism are indicated for the NIS1 locus on the right of the figure. B. Plants from the 19-42 family segregating at the NIS1 locus were grown under low (0N) or high nitrogen (1N) and genotyped with several markers flanking the NIS1 locus. The genotype at NIS1 is indicated. Quantitative phenotype of these group of plants with similar genotype (the number of individual plants is indicated) was established after inoculation with the GUY11 isolate. Statistical differences are shown by *** (p value<0.001; Wilcoxon test).

parental phenotype (breakdown of partial resistance under high nitrogen). We used the GUY11 isolate to screen CSSL lines under high and low nitrogen supply. Out of the 54 lines tested, 38 showed robust resistance under high nitrogen and 16 showed to some extent a breakdown of partial resistance under high nitrogen input. Of these 16, three lines (CSSL4, CSSL5 and CSSL19) reproducibly showed elevated NIS for the GUY11 isolate and also for five other M. oryzae isolates tested (Suppl Figure 1) representative of a large diversity of the fungus (Tharreau D., pers. Comm.). We focused on the further analysis of these three lines.

Comparing the published genetic maps of the CSSLs 4, 5 and 19 suggested that one region of chromosome 1 was common to these lines. However these lines contain several insertions of Kasalath and the phenotype could be explained by different loci in each line. Using CSSL lines that contain overlapping chromosomal substitutions but that were not more susceptible under high nitrogen supply, we could further eliminate segments on all the other chromosomes (Suppl Table 2; data not shown). At this level of analysis, the only segment remaining as associated with the observed increase of blast susceptibility was on chromosome 1 (between RM5718 and RM1095; 8 Mb, Figure 5A).

The CSSL19 line was backcrossed to the Nipponbare parent and F3 or F4 lines were genotyped using microsatellite markers and evaluated for nitrogen-induced susceptibility to GUY11. We next performed further genetic analyses to confirm the existence of this locus and establish the heritability of the phenotype. As shown in Figure 5B, nitrogen-induced susceptibility was as high in plants heterozygous for the chromosome 1 segment than in plants homozygous for the Kasalath allele. We concluded that the nitrogen-induced susceptibility is brought in a dominant manner by the Kasalath allele.

The analysis of several F3 lines derived from a back-cross of the CSSL4 or CSSL19 lines allowed us to confirm that chromosome 1 was sufficient to confer nitrogen-induced susceptibility (Families 4-40; Suppl Table 2). One F3 line (Family 19-42 and siblings; Suppl Table 3) also allowed us to narrow down the interval containing the Kasalath locus responsible for this phenotype. This locus was found in a 3.2 Mb interval between RM7419 and RM1095 markers (Figure 5A) and was called NIS1 (for nitrogen-induced susceptibility 1).

DISCUSSION

We have shown that high nitrogen input before inoculation with M. oryzae increases susceptibility in the rice Kasalath genotype (Nguyen et al, this issue). This phenomenon was called NIS, for nitrogen-induced susceptibility. In this study, we asked whether NIS is affecting different forms of resistance in rice and in wheat. Our data indicate that NIS is a general phenomenon affecting resistance to blast fungus in rice (Figure 2) and wheat (Figure 1). Whether NIS in wheat reflects an agronomical situation remains to be established but our results suggest that high nitrogen input could be an additional element that favors the emergence of this disease on wheat. Moreover, it remains to be established whether our protocol for inducing NIS affects other pathogens, in particular necrotrophic ones like Rhizoctonia solani.

A first report of a differential cultivar response to N fertilizer in regard to rice blast was made based on field experiment (Long et al. 2000a) with higher increase in disease incidence on very susceptible cultivars than in moderately susceptible cultivars. It was also reported that the Kaybonnet cultivar was a higly resistant cultivar in the presence of N fertilizer. In their study, Talukder et al. (2005a) observed that the efficacy of partial resistance was not greatly affected by high nitrogen. This was based on the observation that out of the 12 disease-related QTL detected in a mapping population between Azucena and Bala, six were detected under low and high nitrogen regimes. It is noteworthy that five of these six QTLs originated from the Bala parent, indicating that Azucena and Bala do not have the same potential for displaying robust partial resistance under high nitrogen. This suggested that robustness to NIS could be polymorphic across rice diversity, an hypothesis supported by other reports (Prabhu et al. 1996). However, in most of these analyses, important growth differences provoked by different nitrogen regimes make difficult the interpretation of the phenotypes. Indeed nitrogen impacts on plant growth which in turn modifies epidemiological parameters. Here we used an experimental system that does not strongly affect plant development (Nguyen et al, this issue) to address the question of NIS polymorphism across rice diversity. In our analysis of rice diversity (Figure 2), we show that out of the 14 rice genotypes tested, seven show robust forms of partial resistance. The quantitative levels of NIS, as measured by the increase of susceptible lesion numbers in high nitrogen condition compared to low nitrogen condition, varies from low (e.g. Azucena) to high (e.g. Padi Boenor). Thus the capacity to display NIS is polymorphic in rice. This polymorphism does not seem to relate to the indica/japonica sub-groups. We conclude that robust forms of partial

resistance exist across diversity. This is supporting the observation that six of the QTL conferring partial resistance are not affected under high nitrogen (Talukder et al. 2005a). Scrutinizing diversity will be important to identify robust forms of partial resistance to blast.

Besides partial resistance, breeders mostly use complete resistance driven by R genes. There has been no examination so far of the effect of nitrogen on the efficiency of these forms of resistance. Here we tested the robustness of three different R genes under high nitrogen. We observed that two of the R genes tested, Co39/Pia and Pi2, are not macroscopically affected under high nitrogen (Figure 3). In contrast, the functioning of the Pi1 gene was visibly affected as plants showed more necrotic lesions typical of the hypersensitive response under high nitrogen. Cytological examination indicates that penetration rate is not affected by high nitrogen, a result similar to what was observed in the case of partial resistance (Nguyen et al, this issue). Thus we can exclude the hypothesis that the penetration rate of the fungus is enhanced under high nitrogen as proposed by Talukder et al. (2005a). In contrast, we observed that the fungus grew faster inside the plant under high nitrogen (Figures 3C and 3D). We propose that the increase of visible necrosis under these conditions is due to a mechanical effect of this increased growth. This may be merely due to an increase in the number of cells invaded by the fungus that in turn triggered an enhanced triggering of defense (Figure 4), including cell death, under high nitrogen than under low nitrogen. Very recently, a partial breakdown of resistance to Pseudomonas syringae has been observed when feeding Tobacco plants with NH_4^+ (Gupta et al. 2013). In that case, this breakdown of resistance was associated with a reduction of nitric oxide production, a known HR regulator, and a slight reduction of the expression of one of the eight defense-related genes tested. This case contrasts to our finding and suggests that resistance breakdown in the interaction between rice and M. oryzae does not follow the same trend. In that respect, the example of the Pi1 gene provides to our knowledge the first case of partial breakdown of complete resistance under high nitrogen in rice. This suggests that under certain environmental circumstances, complete resistance may breakdown, irrelevantly of the capacity of the fungus to mutate.

It is noteworthy that the C104Lac line used for testing Pi1 and the C101A51 line used to test Pi2 are derivatives of the Co39 background used to test the Co39/Pia gene (Telebanco-Yanoria et al. 2011). Thus the increase of resistant lesion triggered by Pi1 under high nitrogen pressure is likely an intrinsic property of this resistance gene and not of the Co39 genetic background. This finding was confirmed by the observation that the Pia gene was efficient under high nitrogen in several genetic backgrounds tested (data not shown). While we never

observe sporulation after breakdown of complete resistance triggered by the R genes tested, some R genes could be more prone to NIS than others. It is interesting to note that in the case of Co39/Pia (Figure 3C) and Pi2 (data not shown), the effects of the R genes are visible before penetration while Pi1 does not affect growth of the fungus before penetration. Whether these pre/post-penetration resistance phenotypes are related to the robustness of complete resistance under high nitrogen remains to be established.

Since the study by Talukder et al. (2005a), there has been no report on the genetic analysis of NIS in rice. Here, using a CSSL population between Nipponbare and Kasalath, which show contrasted levels of NIS (Nguyen et al, this issue; Figure 2), we identified a locus, called NIS1, on chromosome 1 (Figure 5A). Analysis of heterozygous plants at this locus indicates that the Nipponbare parent carries a recessive allele of NIS1 and conversely Kasalath a dominant allele conferring nitrogen-induced susceptibility (Figure 5B). As R genes are known to confer resistance in a dominant manner, NIS1 is unlikely caused by an R gene from Nipponbare conferring robust resistance even under high nitrogen. Indeed, if this was the case, such an R gene from Nipponbare would likely confer robust resistance in heterozygous plants under high nitrogen. Rather the NIS1 phenotype is more likely due to a gene from Kasalath that confers induced susceptibility under high nitrogen. The NIS1 locus behaves like six of the loci previously identified (Talukder et al. 2005a) as resistance is only lost under high nitrogen supply. When comparing the genetic maps, we found that NIS1 could be allelic to the QTL 1.2 found by Talukder et al. (2005a). This QTL 1.2 was defined by single-marker analysis and is linked to the C1370 marker which is physically inside the NIS1 interval. However given the method used, the interval defining QTL 1.2 was not established and our work helps defining a small interval containing NIS1 (Figure 5A).

Using available information on disease resistance in rice (Vergne et al. 2008), we found that region defining NIS1 contains several categories of genes that could participate in disease resistance (Figure 5A): NBS-LRR and WAK genes that are involved in pathogen recognition, MAPK genes and Rack1 involved in signal transduction and WRKY genes involved in transcriptional regulation of defense ((Delteil et al. 2010) and references herein). As discussed above, the heritability of NIS1 suggests that NBS-LRR genes are unlikely involved. Similarly, it is unlikely that Kasalath alleles of positive regulators of disease resistance like WRKYs, Rack1 or MAPKs would confer dominant increase of susceptibility. On the opposite, these genes could be responsible for the NIS1 phenotype if they encode for negative regulators of disease resistance and if high nitrogen increases their activity. To some

extent this is possible since: (i) some WRKY transcription factors and MAPKs are negative regulators of disease resistance (Delteil et al. 2012; Xiong and Yang 2003) and (ii) nitrogen status can induce the expression of some WKRY genes (Gregersen and Holm 2007; Lin and Wu 2004). Mis-regulation of such negative regulators could affect the expression of defense-related genes and subsequent setting of quantitative resistance. However, high nitrogen does not strongly affect the transcriptional regulation of defense genes in the case of partial resistance (Nguyen et al, this issue), suggesting that defense mis-regulation by nitrogen may not be responsible for the observed phenotype. Altogether, it is unlikely that the NIS1 phenotype is due to mis-regulation by nitrogen of negative regulators of blast resistance.

From the examination of genes involved in nitrogen metabolism, we found that the NADH-GOGAT1 gene is located in the NIS1 region (Figure 5A). The NADH-GOGAT enzyme is the glutamate synthase (EC 1.4.1.13) responsible of the production of L-glutamine and oxoglutarate by the recycling of glutamate and is thus a key element of the nitrogen assimilation pathway (Forde and Lea 2007; Tabuchi et al. 2007; Zhao and Shi 2006). The central role of the GS-GOGAT cycle in plant disease has been recently reviewed (Seifi et al. 2013). Nipponbare and Kasalath are known to be polymorphic for this enzymatic activity, with Kasalath displaying less NADH-GOGAT protein (Obara et al. 2000). Moreover, over-expression of a japonica allele of GOGAT-NADH1 in the Kasalath background increased grain weight, indicating that this enzyme is limiting in this background for nitrogen utilization as compared to japonica cultivars (Yamaya et al. 2002). In that context, it is yet difficult to understand how the Kasalath allele of NADH-GOGAT1 conferring less activity than the japonica one could dominantly affect susceptibility (Figure 5B). Unfortunately the transgenic lines already described (Yamaya et al. 2002) were lost during the 2011 earthquake in Japan. We tested the ARED12 mutant line available in Nipponbare from the OryzaTagLine library (Larmande et al. 2008) which has an insertion in the NADH-GOGAT1 promoter but the expression of the gene was not affected by this insertion (data not shown). Thus the involvement of the NADH-GOGAT1 gene in NIS remains to be clarified.

As suggested by the possible involvement of the NADH-GOGAT1 gene in NIS, loci involved in the nitrogen physiology could be important. Rice displays a wide range of NUE levels (Koutroubas and Ntanos 2003b) and this result was later reinforced by an independent study on 30 rice accessions (Namai et al. 2009). According to the later results, the Kasalath and Azucena genotypes have high NUE levels whereas other genotypes like Nipponbare, IR8 and IR64 have low NUE levels. Quite interestingly, these two sub-groups of rice lines show

contrasted NIS levels (Figure 2A), with the genotypes with high NUE displaying high NIS levels and vice-versa. This suggests a possible link between NUE and NIS. However, the data from Trembese and Moroberkan do not support this relationship since they show low NIS and NUE levels comparable to Azucena. Nevertheless, these apparently conflicting data can be explained. First Trembese resistance is extremely high (Figure 2) and this does not allow proper analysis of nitrogen-induced susceptibility. Second, although it was not found to be significant, there was a 2.8-fold increase of susceptible lesions (Figure 2A) in Moroberekan. Considering these possible limitations, at this level of analysis the majority of the rice lines with high NUE levels are also the ones displaying high NIS. This is also consistent with the observation that the wheat Arche cultivar that shows high NUE compared to Récital (Le Gouis et al. 2000) is also showing the highest level of NIS (Figure 1). Quite interestingly, the NIS1 locus is syntenic to a meta QTL controlling NUE in several Monocots (Quraishi et al. 2011). Thus NUE and NIS could be connected in the case of wheat and rice blast diseases.

In this work we show that nitrogen-induced susceptibility affects both wheat and rice blast disease and that this phenomenon may be related to NUE. Moreover we show that complete resistance triggered by major resistance genes could also be affected. Finally, having identified rice recombinant lines and cultivars with altered NIS, it is now possible to evaluate how NIS under controlled conditions relates to well-known increased levels of disease in the field.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth, fertilization procedure, inoculation and disease assessment

Wheat and rice plants were sown on Wednesdays in Neuhaus S soil in which poudzolane was added (2L/70L1N). Rice plants were grown as described previously (Faivre-Rampant et al. 2008) and wheat plants were grown at 24°C/20°C, 16h light. Fertilization of the plants, inoculation and disease assessments were done as described in Nguyen et al (this issue).

DNA extraction and microsatellite analysis

CSSL and parent plants tissues were harvested and ground in liquid nitrogen. About 600 µl of powder was then treated with MATAB buffer (Tris HCl 1M pH=8, NaCl 4M, EDTA 0.5M pH=8, Mixed AlkylTrimethyl Aminium Bromide 1%, NaSO4 0.25%) warmed at 65°C, incubated during 30 min at 65°C with shaking every 10 min. A volume of 600 µl of CHCl3 was then added and the samples were vortexed for 30 s. Supernatant was transferred into a new tube and 0.8 volume of isopropanol was added to precipitate DNA. The samples were then centrifuged (30 min, 3 000 rpm). DNA pellets were washed with 70% ethanol and resuspended in distilled water. The DNA for mapping were extracted using a KingFisher 96 machine (http://www.thermo.com) with LGC GENOMICS beadex Maxi Plant Kit (10 X 96) according to the manufacturer's procedure (http://www.lgc.co.uk/).

Rice microsatellites markers were selected from Gramene database (http://www.gramene.org/; (International Rice Genome Sequencing Project 2005). Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a volume of 20 µl in a PTC-100, MJ thermo cycler (MJ Research Inc, USA). The reaction mixture contained each primer at 0.5 µM, 200 µM deoxy nucleotide, Taq buffer, 2 U GoTaq Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 5ng of DNA, completed with distilled water (Gibco) to 20µL. After 5 min at 95°C, the PCR involved 35 cycles of amplification, each cycle comprising 30s at 95°C, 30s at 55°C, 30s at 72°C; and with a final extension step of 5 min at 72°C. Microsatellite amplicons were separated on 3% agarose gels (Sigma).

Tissue staining for confocal observation

Inoculated plant tissues were harvested and fixed in fixation buffer (ethanol/CHCl3 3:1, 0.15% acetic acid) 18h at room temperature. Fixed tissues were stained as described in

(Nguyen, this issue). Observation were performed on LSM700 (ZEISS, http://www.zeiss.com) confocal microscope.

Statistical analysis

Distribution means were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis' test in case of three and more distributions, and using the non-parametric Wilcoxon's test in case of two distributions (at least one distribution was not normal in every comparison). All tests were performed using XLStat software (http://www.xlstat.com/, Addinsoft).

ACKNOWLEDGEMENTS

NT’s work was supported by a PhD grant from the Vietnamese government. This work was supported by the GARP project from the ANR-SYSTERRA program. We are thankful to Christophe Tertois for helping crossing plants.

REFERENCES

Ballini E, Morel J-B, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem J-L, Tharreau D (2008) A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. Molecular Plant and Microbe Interaction 21 (0894-0282 (Print)):859-868

Bonman JM (1992) Durable resistance to rice blast disease - environmental influences. Euphytica 63JLN-705:115-123

Boyd LA, Ridout C, O'Sullivan DM, Leach JE, Leung H (2013) Plant pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. Trends in genetics : TIG 29 (4):233-240

Cesari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, Jauneau A, Rivas S, Alaux L, Kanzaki H, Okuyama Y, Morel J-B, Fournier E, Tharreau D, Terauchi R, Kroj T (2013) The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the Magnaporthe oryzae effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. The Plant Cell Online

Chauhan RS, Farman ML, Zhang HB, Leong SA (2002) Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, Pi-CO39(t), that corresponds to the avirulence gene AVR1-CO39 of Magnaporthe grisea. Molecular Genetics and Genomics 267 (5):603-612

Correa-Vitoria FJ, Zeigler RS (1994) Stability of partial and complete resistance in rice to Pyricularia grisea under rainfed upland conditions in eastern Colombia. Phytopathology Submitted

Debona D, Rodrigues FÁ, Rios JA, Nascimento KJT (2012) Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by Pyricularia oryzae. Phytopathology 102 (12):1121-1129

Delteil A, Blein M, Faivre-Rampant O, Guellim A, Estevan J, Hirsch J, Bevitori R, Michel C, Morel JB (2012) Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. Mol Plant Pathol 13 (1):72-82

Delteil A, Zhang J, Lessard P, Morel J-B (2010) Potential candidate genes for improving rice disease resistance. Rice 3 (1):56-71

Dordas C (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. Agronomy for Sustainable Development 28 (1):33-46

Faivre-Rampant O, Thomas J, Allègre M, Morel J-B, Tharreau D, Nottéghem J-L, Lebrun M-H, Schaffrath U, Piffanelli P (2008) Characterization of the model system rice–Magnaporthe for the study of nonhost resistance in cereals. New Phytologist 180 (4):899-910

Forde BG, Lea PJ (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. Journal of Experimental Botany 58 (9):2339-2358

Gregersen PL, Holm PB (2007) Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (Triticum aestivum L.). Plant Biotechnology Journal 5 (1):192-206

Gupta KJ, Brotman Y, Segu S, Zeier T, Zeier J, Persijn ST, Cristescu SM, Harren FJM, Bauwe H, Fernie AR, Kaiser WM, Mur LAJ (2013) The form of nitrogen nutrition affects resistance against Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in tobacco. Journal of Experimental Botany 64 (2):553-568

Hua L, Wu J, Chen C, Wu W, He X, Lin F, Wang L, Ashikawa I, Matsumoto T, Wang L, Pan Q (2012) The isolation of Pi1, an allele at the Pik locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. Theor Appl Genet 125 (5):1047-1055. doi:10.1007/s00122-012-1894-7

International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. Nature 436 (7052):793-800

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444 (7117):323-329
Kohli MM, Mehta YR, Guzman E, De Viedma L, Cubilla LE (2011) Pyricularia Blast – a threat to wheat cultivation. Czech Journal of Genetic and Plant Breeding 47 (Special Issue):S130-S134
Koutroubas SD, Ntanos DA (2003) Genotypic differences for grain yield and nitrogen utilization in Indica and Japonica rice under Mediterranean conditions. Field Crops Research 83 (3):251-260. doi:10.1016/s0378-4290(03)00067-4
Larmande P, Gay C, Lorieux M, Périn C, Bouniol M, Droc G, Sallaud C, Perez P, Barnola I, Biderre-Petit C, Martin J, Morel JB, Johnson AAT, Bourgis F, Ghesquière A, Ruiz M, Courtois B, Guiderdoni E (2008) Oryza Tag Line, a phenotypic mutant database for the Génoplante rice insertion line library. Nucleic Acids Research 36 (suppl 1):D1022-D1027
Le Gouis J, Béghin D, Heumez E, Pluchard P (2000) Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. European Journal of Agronomy 12 (3–4):163-173
Lin J-F, Wu S-H (2004) Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. The Plant Journal 39 (4):612-628
Long DH, Lee FN, TeBeest DO (2000) Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. Plant Disease 84 (4):403-409
Namai S, Toriyama K, Fukuta Y (2009) Genetic variation in dry matter production and physiological nitrogen use efficiency in rice (Oryza sativa L.) varieties. Breeding Science 59:269-276
Obara M, Sato T, Yamaya T (2000) High content of cytosolic glutamine synthetase does not accompany a high activity of the enzyme in rice (Oryza sativa) leaves of indica cultivars. Physiologia Plantarum 108 (1):11-18
Okuyama Y, Kanzaki H, Abe A, Yoshida K, Tamiru M, Saitoh H, Fujibe T, Matsumura H, Shenton M, Galam DC, Undan J, Ito A, Sone T, Terauchi R (2011) A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. Plant J 66 (3):467-479
Otani Y (1959) Studies on the relation between the principal components of the rice plant and its susceptibility to the blast disease, 3. Annals of the Phytopathological Society of Japan 16:97-102
Ou SH (1972) Studies on stable resistance to rice blast disease. Rice Breeding:227-237
Parlevliet JE, van Ommeren A (1975) Partial resistance of barley to leaf rust Puccinia hordei. II. Relationship between field trials micro plot tests and latent period. Euphytica 24:293-303
Prabhu AS, Filippi MC, Zimmermann FJP (1996) Genetic control of blast in relation to nitrogen fertilization in upland rice. Pesqui Agropecu Bras 31 (5):339-347
Quraishi UM, Abrouk M, Murat F, Pont C, Foucrier S, Desmaizieres G, Confolent C, Rivière N, Charmet G, Paux E, Murigneux A, Guerreiro L, Lafarge S, Le Gouis J, Feuillet C, Salse J (2011) Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-metaQTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution. The Plant Journal 65 (5):745-756
Roumen EC (1994) A strategy for accumulating genes for partial resistance to blast disease in rice within a conventional breeding program. In: Zeigler R, Leong S, Teng P (eds) International Symposium on rice blast disease. CAB International/IRRI, Madison, USA, pp 245-265
Seifi HS, Van Bockhaven J, Angenon G, Höfte M (2013) Glutamate metabolism in plant disease and defense: friend or foe? Mol Plant-Microbe Interact 26 (5):475-485
Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T (2007) Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (Oryza sativa L.). Journal of Experimental Botany 58 (9):2319-2327

Talukder ZI, McDonald AJS, Price AH (2005) Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL x environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. New Phytologist 168 (2):455-464

Tanaka I (1961) Analytical studies on the environmental conditions related to epidemics of rice blast disease in Hokkaido. Hokkaido Nat Agr Exp Station 55:1-58

Telebanco-Yanoria M, Koide Y, Fukuta Y, Imbe T, Tsunematsu H, Kato H, Ebron L, Nguyen T, Kobayashi N (2011) A set of near-isogenic lines of Indica-type rice variety CO 39 as differential varieties for blast resistance. Molecular Breeding 27 (3):357-373

Vergne E, Ballini E, Droc G, Tharreau D, Notteghem JL, Morel JB (2008) ARCHIPELAGO: A dedicated resource for exploiting past, present, and future genomic data on disease resistance regulation in rice. Mol Plant-Microbe Interact 21 (7):869-878

Vergne E, Grand X, Ballini E, Chalvon V, Saindrenan P, Tharreau D, Notteghem JL, Morel JB (2010) Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen Magnaporthe oryzae. BMC Plant Biol 10:206

Wan XY, Wan JM, Jiang L, Wang JK, Zhai HQ, Weng JF, Wang HL, Lei CL, Wang JL, Zhang X, Cheng ZJ, Guo XP (2006) QTL analysis for rice grain length and fine mapping of an identified QTL with stable and major effects. Theor Appl Genet 112 (7):1258-1270

Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ (1994) RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421-1434

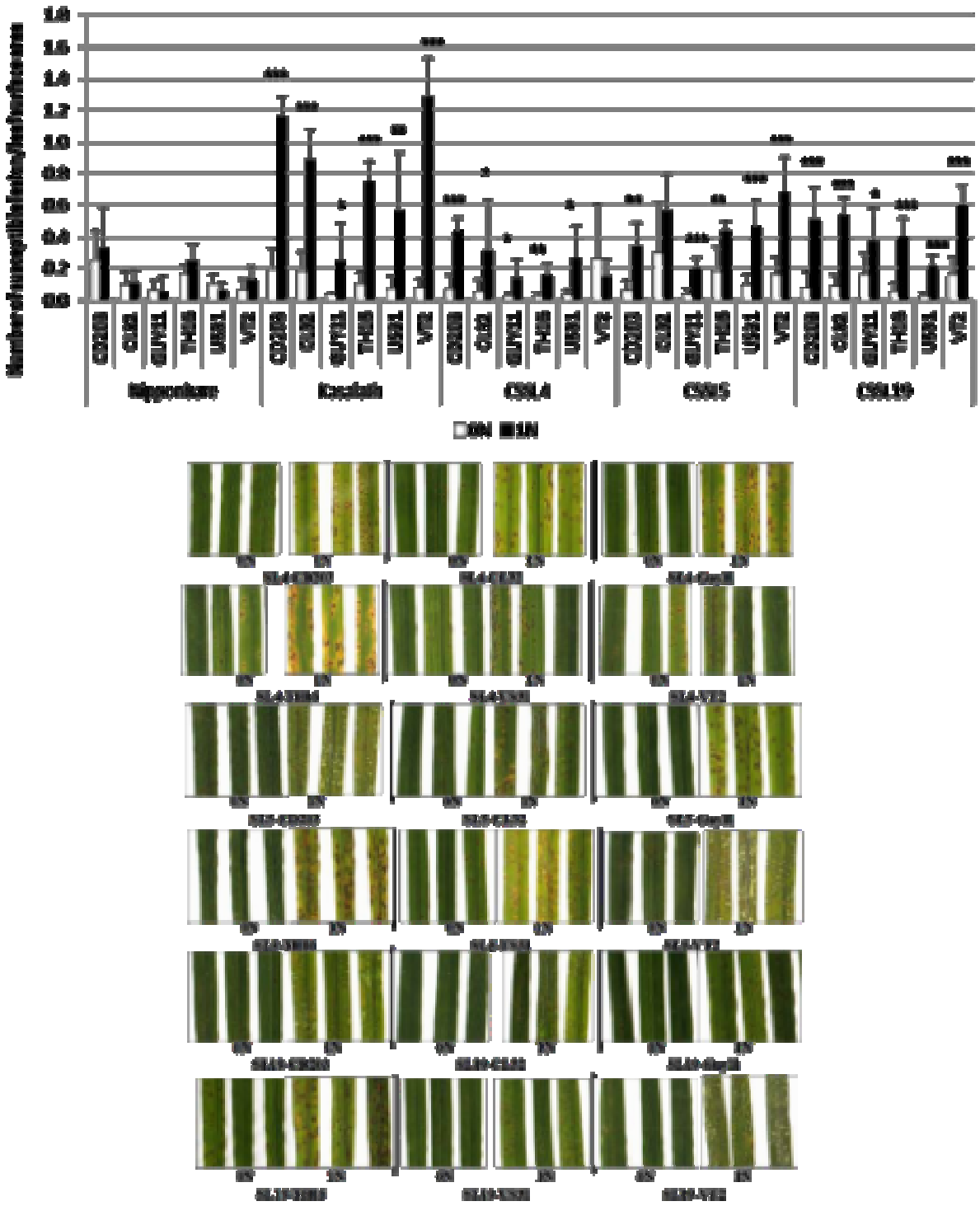
Xiong L, Yang Y (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. Plant Cell 15 (3):745-759

Yamaya T, Obara M, Nakajima H, Sasaki S, Hayakawa T, Sato T (2002) Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. Journal of Experimental Botany 53:917-925

Yang F, Jensen JD, Spliid NH, Svensson B, Jacobsen S, Jørgensen LN, Jørgensen HJL, Collinge DB, Finnie C (2010) Investigation of the effect of nitrogen on severity of Fusarium Head Blight in barley. Journal of Proteomics 73 (4):743-752

Zhao X-Q, Shi W-M (2006) Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (Oryza sativa) seedlings. Plant Sci 170 (4):748-754. doi:10.1016/j.plantsci.2005.11.006

Zhou B, Qu SH, Liu GF, Dolan M, Sakai H, Lu GD, Bellizzi M, Wang GL (2006) The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between Pi2 and Piz-t resistance proteins determine the resistance specificity to Magnaporthe grisea. Mol Plant-Microbe Interact 19 (11):1216-1228



Supplemental Figure 1. Nitrogen-induced susceptibility in CSSL4, 5 and 19 identifying the NIS1 locus.

Nitrogen (black bars; 1N) or no nitrogen (white bars; 0N) was added to rice plants one day before inoculation with the indicated isolate of M. oryzae. Susceptible lesions were counted 7 days post-inoculation. Statistical differences between 0N and 1N are shown (Wilcoxon tests; *: $p<0.05$; **$p<0.01$; ***: $p<0.001$). Typical symptoms are shown.

		Magnaporthe oryzae isolate		
rice accession		Guy11	CD203	CL26
Nipponbare	temperate japonica	Robust partial Resistance	Robust partial Resistance	Robust partial Resistance
IR64	indica	Robust complete Resistance	Robust complete Resistance	Robust complete Resistance
Trembese	tropical japonica	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen	Robust partial Resistance
IR8	indica	Robust complete Resistance	Robust complete Resistance	More susceptible with Nitrogen
Moroberekan	tropical japonica	Robust partial Resistance	Robust partial Resistance	Robust partial Resistance
Pao Tou Hung	indica	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen	Robust partial Resistance
Petita janggut	indica	More susceptible with Nitrogen	na	More susceptible with Nitrogen
Ta Mao Tao	temperate japonica	More susceptible with Nitrogen	na	More susceptible with Nitrogen
Azucena	tropical japonica	More susceptible with Nitrogen	na	Robust partial Resistance
Maratelii	temperate japonica	More susceptible with Nitrogen	na	More susceptible with Nitrogen
Kasalath	Aus	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen
Chuan 4	temperate japonica	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen
Popot 165	indica	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen
Padi Boenor	indica	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen	More susceptible with Nitrogen

Supplemental Table 1: NIS across rice and M. oryzae diversity

	chromosome and microsattelite markers									
	1	1	2	4	4	4	4	4	9	
	RM11219	RM5931	RM406	RM551	RM16502	RM241	RM3335	RM23865	Phenotype under high N
4-40-7	kas	kas	Nip	Nip	Nip	Nip	Nip	Nip	More Susceptible
4-40-8	kas	kas	Nip	Nip	Nip	Nip	Nip	Nip	More Susceptible
4-40-20	kas	kas	kas	kas	kas	Nip	Nip	Nip	More Susceptible
19-24	kas	kas	Nip	Nip	Nip	Nip	Nip	Nip	More Susceptible

Supplemental Table 2: Recombinant lines establishing NIS1 on chromosome 1

		More susceptible in IN				No difference in IN and ON	
Marqueur	Position (Mbp)	CSSL4	CSSL5	CSSL19	19-42-4	19-42-2	CSSL9
RM7075	15.12	Nip	Nip	Kas	Kas	Kas	Kas
RM11007	17.95	Nip	Nip	Kas	Kas	Kas	Kas
RM1196	21.00	Kas	Nip	Kas	nd	nd	nd
RM11219	22.16	Kas	Nip	Kas	Nip	Nip	nd
RM5718	22.93	Kas	Nip	Kas	Nip	Nip	Nip
RM6716	23.12	Kas	Nip	Nip	Nip	Nip	Nip
RM2318	24.14	Kas	Nip	Nip	Nip	Nip	Nip
RM3440	27.19	Kas	Kas	Nip	Nip	Nip	Nip
RM7419	27.70	Kas	Nip	Nip	Nip	Nip	nd
RM7566	27.77	Kas	nd	Kas	Kas	Nip	nd
RM11522	28.07	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip
RM11504	28.11	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip
RM11563	28.16	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip
RM5931	29.28	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip
RM11581	29.46	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip
RM11594	29.62	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip
RM6702	29.77	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip
RM5815	29.81	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip
RM1152	30.09	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip	nd
RM11631	30.52	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	nd
RM11648	30.71	Kas	Kas	Kas	Kas	Nip	nd
RM1095	30.92	Kas	Kas	Kas	Nip	Nip	nd
RM11658	31.04	Nip	Kas	Kas	Nip	Nip	nd
RM8097	31.41	Nip	Kas	Kas	nd	nd	nd
RM11668	31.42	Nip	Kas	Kas	Nip	Nip	nd

Supplemental Table 3: Further mapping of the NIS1 locus

DISCUSSION

Cette thèse nous a permis de clarifier, au moins en condition contrôlée, certains des effets de la fertilisation azotée sur la sensibilité du riz à M. oryzae. Nous avons pu confirmer l'impact de l'azote sur les deux grands types de résistances (complètes et partielles) et ainsi identifier des variétés présentant une résistance robuste même en présence d'azote alors que d'autres variétés présentent une sensibilité accrue en présence d'azote. Nous avons appelé ce phénotype de sensibilité accrue « Nitrogen Induced Susceptibility » (NIS). Nous avons caractérisé ce phénomène au niveau macroscopique et microscopique. Une cartographie d'un locus impliqué dans la NIS a également été effectuée. Ce travail a abouti à la soumission de deux articles. Nous avons ainsi exploré plusieurs des hypothèses de lien entre l'azote et la maladie que nous avions formulées (voir introduction). Je propose dans cette discussion de revenir sur certains des résultats et sur ces hypothèses. Je terminerai par quelques propositions de perspectives sur ce travail.

1. Caractérisation de la NIS : Une sensibilité accrue du riz en présence d'une fertilisation azotée

Nous avons mis au point au laboratoire un protocole de fertilisation et d'inoculation en conditions contrôlées. Nous avons choisi de mettre au point ce protocole sur terreau et non sur milieu artificiel ou en hydroponie. Cependant ces conditions ne sont pas diffèrent des conditions de cultures au champ. Afin de comparer avec les conditions au champ, des expériences sont en cours de réalisation par des collaborateurs à Colombie.

Nous avons pu mettre en évidence que lorsque les plantes sont fertilisées avez une fertilisation azotée elles sont plus sensibles à la pyriculariose pendant plusieurs jours. Nous avons appelé ce phénomène la NIS (Nitrogen Induced Susceptibility). Le maximum de sensibilité est atteint lorsque les plantes sont fertilisées un jour avant l'inoculation par M. oryzae (figure 2B, article 1). Nous avons également observé que l'ammonium semblait mieux provoquer la susceptibilité que le nitrate, de manière cohérente avec le rapport précédent (Otani 1959) (figure 2A, article 1).

Nous avons caractérisé dans nos conditions ce phénotype au niveau macroscopique et microscopique. Au niveau macroscopique, nous avons observé une augmentation du nombre de lésions ainsi que de la taille des lésions, confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment (Otani 1959; Matsuyama and Dimond 1973). De plus, le suivi cytologique de l'infection par M. oryzae nous a permis de mettre en évidence que la pénétration du champignon n'était pas modifiée par la présence d'azote alors que sa croissance était impactée (figure 3, article 1). Nous n'avons pas mesuré l'effet sur la sporulation mais cela aurait pu être un trait intéressant à mesurer. Ces résultats sont contraires à l'hypothèse formulée par Talukder et al (2005) que le taux de pénétration du champignon est accru sous apport azoté élevé. Ainsi, Robinson (1981) a montré qu'une augmentation de la concentration d'acides aminés dans l'apoplaste et sur la surface de la feuille en condition de forte fertilisation d'azotée favoriserait la germination et la croissance des conidies du champignon Drechslera sorokinian chez canne à sucre (Robinson and Hodges 1981). Dans notre cas, la croissance de M. oryzae est accrue en surface sous fort apport azoté mais cette augmentation de croissance n'induit pas une augmentation finale du taux de pénétration. Ce n'est donc pas cet effet qui

provoque l'augmentation finale du nombre de lésions mais bien la croissance in planta du champignon qui est accélérée.

Par ailleurs, nous avons également caractérisé ce phénomène dans le pathosystème blé / M. oryzae (figure 1, article 2). De plus nous avons choisi d'utiliser des conditions de culture du riz en condition pluviale, ce qui devrait nous permettre de transférer au blé les connaissances que nous allons obtenir sur notre pathosystème riz/M. oryzae de référence. Il pourra être également intéressant d'étudier les effets de la fertilisation azotée sur d'autres maladies du riz ou du blé. Nous proposons une étude au Puccinia graminis chez le blé, une maladie affectée par une forte fertilisation azotée (Howard et al. 1994).

2. La résistance complète peut elle aussi être modifiée par la fertilisation azotée

Des résultats précédents au champ avait mis en évidence que toutes les variétés n'étaient pas systématiquement plus sensibles en présence d'une fertilisation azotée (Long et al. 2000b; Mukherjee et al. 2005b). Nous avons confirmé ce résultat dans nos conditions en utilisant un panel de 14 variétés que nous avions précédemment caractérisées pour leur niveau de résistance à la pyriculariose (Vergne et al. 2010). Sept variétés présentent une résistance (complète ou partielle) qui n'est pas impactée par la fertilisation azotée. Par contre 7 autres variétés présentent une sensibilité accrue de type NIS (figure 2, article 2). Cette sensibilité accrue ne semble pas corrélées avec la différence liée aux sous-groupes indica / japonica.

De manière intéressante, parmi les variétés présentant une sensibilité accrue nous avons mis en évidence que les variétés possédant une forme de résistance complète pouvaient elles aussi être impactées. Ce résultat a été confirmé en utilisant un panel de variétés contenant trois gènes de résistance couramment utilisés au laboratoire : CO39/Pia (Chauhan et al. 2002), Pi1 (Hua et al. 2012a) et Pi2 (Zhou et al. 2006). Nous avons observé que deux des gènes testés, Co39/Pia et Pi2, ne sont pas affectés en présence de fertilisation azotée. En revanche, la fertilisation azotée affecte la résistance conférée par le gène de résistance Pi1 (figure 3A). Les plantes ont montré plus de lésions nécrotiques typiques de la réponse hypersensible. L'examen cytologique montre que le taux de pénétration de M. oryzae n'est pas différent sous un régime riche en azote, mais qu'une augmentation de croissance du champignon après la pénétration est observée. A notre connaissance, c'est la première fois que l'on met en évidence un effet de la fertilisation azotée sur la résistance complète chez le riz. Nous proposons comme hypothèse que l'augmentation des lésions nécrotiques visible en présence d'azote est due à un effet mécanique de l'augmentation de la croissance mycélienne après un échec temporaire du système de résistance déclenché par le gène de résistance. Un effet de la forme de l'apport d'azoté sur la mise en place de la HR a été mis en évidence dans le pathosystème tabac/Pseudomonas et chez le mutant Atnud6/Atnud7 d'Arabidopsis (Gupta et al. 2013). La mise en place de la HR serait plus rapide en présence de NO3 par rapport à NH4 (Gupta et al. 2013). De même, Wang et al (2013) ont montré que des taux faibles en NH4 contribuent à la mise en place de la HR chez le mutant nudt6-2/nudt7 (Wang et al. 2013).

Cette étude a également montré que les gènes Pia et Pi2 provoquent des arrêts de croissance du champignon en surface de la plante, contrairement au gène Pi1. Il serait intéressant de comprendre si la robustesse des gènes Co39/Pia et Pi2 est due au fait que l'azote n'a pas d'impact majeurs aux stades pré-pénétration. L'examen d'autres gènes de résistances clonés pourrait permettre de déterminer si cette observation s'étend à d'autres cas.

3. Cartographie d'un locus du riz important pour la NIS : un lien possible entre NUE et NIS ?

L'analyse de la sensibilité des lignées de la population CSSL, issue du croisement entre un parent présentant une résistance partielle robuste (Nipponbare) et un parent présentant une résistance peu robuste (Kasalath) a révélé la présence d'une région du génome, appelée NIS1, qui est important pour la sensibilité du riz à M. oryzae en présence d'azote (fugure 5A, article 2). Un QTL similaire et potentiellement allélique à NIS1 avait été trouvé précédemment par Talukder et al. (2005).

La région NIS1 contient plusieurs catégories de gènes qui pourraient participer à la résistance: des gènes MAPK et RACK1 impliqués dans la transduction du signal, un cluster de NBS-LRR et des gènes WAK qui sont impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes et enfin des gènes WRKY impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la défense. Cependant, compte tenu de la génétique associée au locus NIS1 (allèle Nipponbare récessif) et au fait que les gènes cités plus hauts sont souvent des régulateurs positifs de la résistance, il est peu probable que l'un de ces gènes soit responsable de l'effet NIS1.

Par ailleurs, le NADH-GOGAT1, un gène important dans le métabolisme azoté est également présent dans ce locus NIS1. Ce gène, qui code pour la glutamate synthase, responsable de la production de L-glutamine et oxoglutarate par le recyclage du glutamate, est un élément clef du métabolisme azoté (Tabuchi et al. 2007). Chez le riz, la NADH-GOGAT1 jouerait un rôle dans la croissance et le développement (Yamaya et al. 2002) et dans le phénotype de NUE (Yamaya et al. 2002; Andrews et al. 2004).

Dans ce travail, nous avons observé que des variétés de riz avec un niveau de NUE élevé présentent une forte NIS. Nous avons également observé qu'un cultivar du blé Arche ayant un niveau haut de NUE (Legouis et al. 2000), présente aussi une forte NIS. Ceci suggère que NUE et NIS pourraient être connectés dans le cas de la pyriculariose du blé et du riz.

Il serait intéressant d'approfondir l'étude de la relation le NUE et NIS du riz. Par exemple on pourrait tester un plus grand panel de variétés bien caractérisées pour leur niveau de NIS. L'analyse de sur-expresseur du gène NADH-GOGAT permettrait aussi de voir si le niveau d'expression de ce gène influe sur la NIS.

4. Bilan des pistes à explorer pour expliquer l'effet de la fertilisation azotée sur la pyriculariose ?

L'effet de la fertilisation azotée sur la densité du couvert végétale et plus généralement sur l'architecture du couvert, et par voie de conséquence sur les épidémies, est analysé par des collaborateurs au champ à Madagascar (Dusserrea et al. 2012). Nos travaux ont eu examiné les effets de la fertilisation azotée à « croissance constante ».

Nous avions proposé plusieurs hypothèses pour expliquer l'impact de la fertilisation azotée sur la pyriculariose.

1. Nous n'avons pas exploré directement l'effet de l'azote sur la résistance physique des cellules de riz ; cependant nous avons mis en évidence que si le taux de pénétration du champignon n'était pas modifié dans nos conditions, la vitesse de croissance du champignon est augmentée in planta. Cela laisse supposer que la résistance physique pourrait être modifiée, comme suggéré par Talukder et al (2005).
2. Nous avions supposé que la fertilisation azotée pouvait avoir un effet sur la composition des cellules de riz et rendre ainsi les cellules plus riches en nutriments nécessaires à la croissance du champignon. Nous avons mis en évidence de légères différence de composition azotée au moment de l'inoculation dans nos conditions, en accord avec les hypothèses précédentes (Talukder et al. 2005a; Matsuyama and Dimond 1973). Ces différences semblent perçues par le champignon, comme en témoigne les niveaux d'expression de gènes normalement induits par la carence azotée. Nos tests des effets d'apports en acides aminés après inoculation renforcent cette hypothèse que la croissance accrue du champignon sous fort apport azoté peut être due à une disponibilité plus élevée en acides aminés nécessaires. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en mesurant l'activité métabolique de certaines enzymes et en mesurant la variation de la composition de certains acides aminés.
3. D'autre part, lorsque nous avons suivis l'expression de gènes de défense, nous n'avons pas pu mettre en évidence une modification de leur expression en présence de fertilisation azotée. Ces résultats sont contraires aux résultats précédents dans lesquels certains gènes de défense sont induit en carence azotée (Lian et al. 2006; Cai et al. 2012b). Ces données bibliographiques nous avaient amenés à faire l'hypothèse d'un affaiblissement des défenses sous fort apport d'azote.

5. Perspectives

Suite à ce travail, plusieurs pistes pourraient être suivies afin de mieux comprendre l'effet de la fertilisation azotée sur la sensibilité du riz à la pyriculariose.

Compte tenu des difficultés rencontrées pour effectuer la cartographie, nous ne souhaitons pas effectuer une cartographie plus fine du locus NIS1. En effet, le phénotypage de la NIS nécessite de disposer de lignées recombinantes F3 ou F4 fixées pour pouvoir tester les

deux conditions (0N et 1N), ce qui retarde la génération de données. Cependant un phénotypage de la population Nipponbare X Kasalath est en cours au champ en Bolivie. La présence de NIS1 pourra ainsi éventuellement être confirmée dans des conditions de terrain.

Par ailleurs, la caractérisation de la NIS dans un panel de variétés couramment utilisées dans les schémas de sélection pourrait être importante pour les sélectionneurs. Le protocole que nous avons mis au point pourrait permettre cette caractérisation de manière simple et peu coûteuse et pourrait facilement être transféré à des sélectionneurs. De plus, il pourrait être envisagé de continuer l'identification de loci important pour la NIS en utilisant les outils de la génétique d'association. En effet, plusieurs études de génétique d'association ont déjà été publiées sur le riz et plusieurs bases de données de SNP sont disponibles (McNally et al. 2009; Zhao et al. 2011; Huang et al. 2010). Notamment 44 000 SNP sont disponibles sur 413 variétés du riz de référence (Zhao et al. 2011). Il serait également envisageable d'utiliser des données de SNP obtenues dans des programmes du Cirad.

Nous avons pu mettre en évidence un lien entre l'azote et la résistance complète. Notamment, nous avons observé que le gène Pi1 est moins robuste en présence d'azote alors que deux autres gènes, Pia et Pi2, restent robustes. Il serait intéressant de comprendre quelle est l'influence de l'azote sur la mise en place de la résistance complète. Une voie à explorer serait de comprendre l'influence des différentes formes azotées sur la production de ROS. En effet des liens entre ammonium et production de NO ont été mis en évidence chez Arabidopsis et le tabac (Wang et al. 2013; Gupta et al. 2013).

Enfin, nous avons mis en évidence un lien important entre le cycle infectieux du champignon et l'azote. Il pourrait être intéressant de préciser quels sont les formes azotées essentielles au développement du champignon et à quels stades. Il est important de comprendre si/quand M. oryzae est capable de puiser les acides aminés présents dans la plante. Dans un premier temps il pourrait être intéressant de mesurer l'impact de certains acides aminés sur la croissance mycélienne du champignon en milieu de culture et in planta. Il pourra également être intéressant de s'appuyer sur les ressources disponibles chez M. oryzae. En effet, plusieurs mutants du métabolisme azoté ont été identifiés : PTH3, (voie de l'histidine), ILV5 (voie de leucine, valine), MET (voie de la méthionine). Ces mutants jouent sont affectés dans leur pouvoir pathogène (Lebrun M.H, communication personnelle).

Nous pourrions caractériser ces mutants dans nos conditions. Des mutants dans le métabolisme azoté de Magnaporthe ont été obtenus et présentent un taux de différenciation appressoriale faible, si bien que ces mutants sont non-pathogènes. Il serait intéressant de tester si ces mutants récupèrent une partie de leur pouvoir pathogène sur des plantes richement fertilisées en azote. Ceci permettant alors de montrer que l'effet de l'azote sur la résistance du riz à Magnaporthe passe par le champignon plus que par la plante.

ANNEXE

1. Protocole engrais retarde

La composition dans un granulé :

Ammonium (NH4): 6.5%; Nitrate (NO3): 4.5%; Anhydride phosphorique (P2O5): 9%; Oxyde de potassium (K2O): 19% ; Oxyde de magnésium (MgO): 2% ; Anhydride sulfurique (SO3): 17.5% ; Bore (B): 0.02%; Cuivre (Cu) : 0.05%; Fer (total Fe) : 0.4%; Manganèse (Mn) : 0.06% ; Molybdène (Mo) : 0.015% ; Zinc (Zn) : 0.02%

2. Cultures, repiquage du riz

2.1. Culture du riz

Objet et domaine d'application :

Les semis de culture du riz sont réalisés en serre ou phytotron, pour des plantes âgées de 0 à 8 semaines dans le cadre d'une utilisation expérimentale des plantes, et pour des plantes âgées de 0 à 4 semaines pour des plantes qui seront repiquées et dont la destinée sera la production de semences.

Matériel nécessaire :

Les semis sont réalisés en petit pot, grand pot, terrines ou plaques de semis selon l'utilisation.

Réactifs :

Terreau (Neuhaus S) pH de 4 à 4.5, 70 litre dans un sac, Pouzzolane 2 pelles pour 70l de terreau

Engrais et éléments minéraux :

Algospeed: 17% azote + 7%P2O5 + 22% K2O, Ferveg 6: Fe = 6%

Conditions de culture

L'éclairage alterne entre des périodes lumineuses de 400 à 600 W/m^2 et des périodes d'obscurité de 12h chacune dans le cas d'une culture en phytotron. L'éclairage est naturel en serre, il est complété artificiellement en période hivernale pour conserver une alternance de 12h entre les périodes claires et sombres. Les températures maximales sont 28°C en période claire et 21°C en période sombre.

2.2. Repiquage du riz

Objectif d'application :

Le repiquage du riz est nécessaire dans le but d'obtenir les semences de la descendance.

Méthode :

Transfert de plantules de riz dans des pots de taille suffisante pour contenir la quantité de terreau nécessaire à leur subsistance jusqu'à ma récolte des grains.

Contenu du mode opératoire-protocole :

Le repiquage doit s'effectuer au maximum 6 semaines après semis (avant tallage) et pour une plante en bon état sanitaire, débarrassée des feuilles sénescentes.

Ajouter 100g d'Osmocote exact 10N-11P2O4-18K2O avec oligo éléments et 50g d'engrais organique 9N-7P2O4-18K2O avec bactiflore.

3. Culture, inoculation et conservation de Magnaporthe oryzae

3.1. Culture de Magnaporthe oryzae

Object :

Culture et conservation d'isolats de Magnaporthe oryzae en laboratoire

Méthode :

Culture des isolats sur milieu solide réalisé à partir de farine de riz et conservation des isolats sur du papier filtre sous vide d'air et placer à -20°C.

Milieu de culture :

Agar 15g/l, farine de riz 20g/l, extrait de levure 2.5g/l, autoclavage 20 min à 120°C, Pénicilline G 500 000U.I./l

Contenu du mode opératoire-protocole:

Prendre le sachet de filtre du champignon et déposer environ 3-4 morceaux de filtre dans une pétri le milieu de culture. Placer la boîte en chambre de culture à 25°C et contrôler la culture du champignon régulièrement. Une culture sporulant optimale est généralement obtenue dix jours après mise en culture.

3.2. Inoculation

3.2.1. Inoculation

La pulvérisation la suspension des spores sur des feuilles. Le plateau rotatif permet de faire tourner le bac de riz pour une répartition homogène de la suspension sur la totalité de la surface foliaire à couvrir. Les bacs de riz inoculés sont placés sur un tablar mobile et il est introduit dans le phytotron d'inoculation. 24h heures plus tard transférer les bacs dans un phytotron prévu pour plantes infectées.

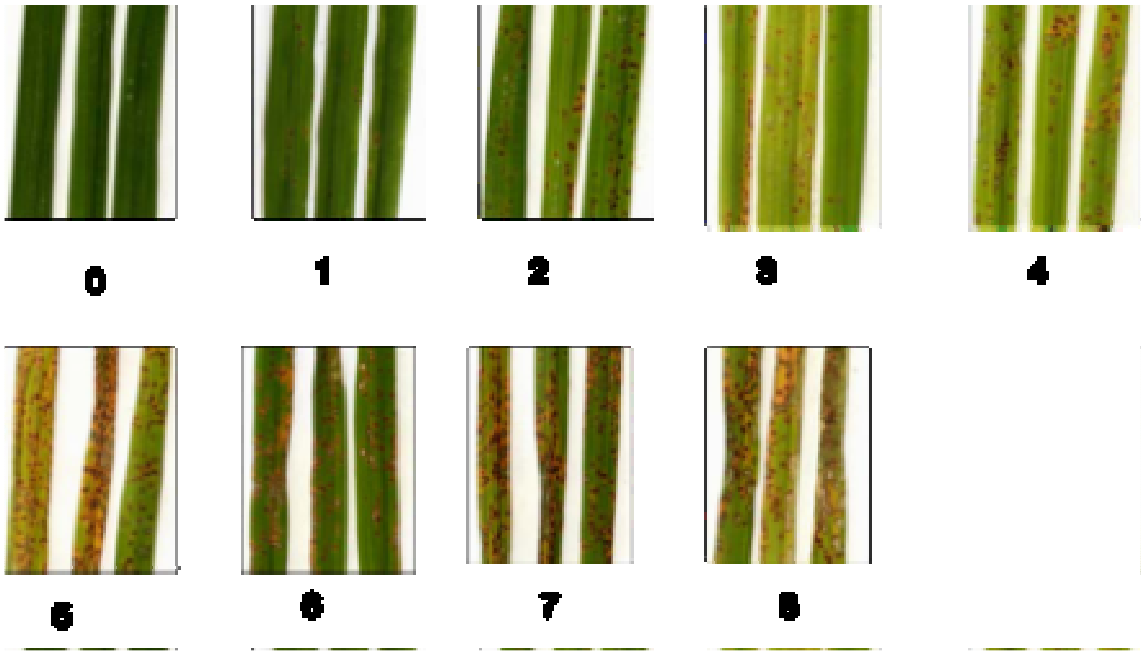


Figure 28: Echelle de symptôme

3.2.2. Comptage lésion

Les feuilles du riz ont été collées et scannée avec une résolution 400dpi. Les images ont été analysées au moyen logiciel ImageJ (hppt://imagej.nih.gov/ij/) et les lésions de type HR ou sensibles ont été comptées grâce à l'outil « cell counter». Les données obtenues ont été analysées par Excel.

4. Extraction ADN

Une heure avant l'extraction : placer la solution de MATAB en étuve 65°C.

Sortir les boites de tubes ou barrettes dans l'azote liquide. Pour les barrettes, ajouter 450µl, pour les tubes, ajouter 600µl MATAB à 65°C. Incuber 30 min à 65°C en agitant toutes les 10 min, et puis laisser refroidir. Ajouter 450µl chloroforme dans les barrettes et 600µl dans les tubes et agiter. En suite centrifuger 10 minutes à 3000rpm. Transférer 300µl du surnageant dans les nouveaux barrettes ou 600µl du surnageant dans les nouveaux tubes. Pour les barrettes, ajouter 240µl isopropanol pour 300µl transférés ou pour les tubes, 500µl isopropanol pour 600µl transférés et agiter et centrifuger 30 min à 3000 tours/min. Eliminer le surnageant en renversant les tubes. Ajouter 300µl d'éthanol 70%. Ne pas agiter. Et centrifuger 10 min à 3000 tours/min. Eliminer l'éthanol. Mettre en suspension dans 20 à 40µl H2O ultra pure selon objectifs. Stocker à –20°C.

5. Extraction ARN de feuille de riz pour expression par qPCR

Contenu du mode opératoire protocole

Tubes contenant 2 billes d'acier et 200 mg de feuille. Quatre runs de 30 secondes et de vitesse 30 oscillations/s sont nécessaires pour broyer entièrement une plaque. Tubes à conserver dans l'azote ou à recongeler à -80°C après broyage.

Ajouter 1 mL de TRI Reagent et laisser reposer 15 minutes à température ambiante. Déposer le TRI Reagent et vortexer. Centrifuger à 12 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Transférer le surnageant dans nouveau tube de 1.5 mL. Ajouter 200 µL de chloroforme et agiter vigoureusement pendant 15 secondes, laissé reposer 5 minutes à t° ambiante. Centrifuger à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Obtention de 3 phases : phase organique rouge (protéique), interphase (ADN), phase aqueuse supérieure (ARN). Transférer la phase aqueuse (± 400 µl) dans un nouveau tube 1,5 mL. Ajouter 200 µL d'isopropanol, en suite mélanger et laisser reposer les échantillons à t° ambiante 5-10 mins. Centrifuger à 12 000 g pendant 15 mins à 4 °C, l'ARN précipité forme un culot au fond du tube. Jeter le surnageant et laver le culot avec 1 mL d'EtOH 75 %. Centrifuger à 10 000 g pendant 5 minutes à 4 °C. Eliminer EtOH 75 %. Centrifuger rapidement et enlever le maximum d'EtOH 75 % avec P-200. Sécher à t° ambiante pendant 10-15 min. Ajouter 30-50 µL H_2O UP. Dissoudre en pipetant/vortexant

Analyse des ARN extrait :

Lecture à 260 nm et faire rapport 260/280 nm (> 1,7). [ARN] = DO_{260} x 40 x facteur de dilution (100, 1 µlL dans 100 µL). Migration sur gel d'agarose 1 %, solution de charge Orange G (1mg/mL dans 30 % glycérol, filtré 0.4 µm ou autoclavé, aliquoté en epp. 1.5 mL, conservation à TA), Dépôt de 0,5 µg d'ARN (dans 10 µL et ajouter 2 µL de sol. de charge). Etalon 1kb (4 µL), Migration à 80 mV

6. Traitement DNAse et transcription inverse ARN extrais

Traitement DNase :

3µl Buffer+MgCl2 Fermentas pour 25µL ARN brut, 2µl DNase I Fermentas pour 25µL ARN brut, Incuber 30 min à 37°C. Ensuite, ajouter 2µl EDTA pour 25µl ARN brut, et puis incuber dans 10 min à 65°C, ensuite, doser les ARN DNasés au Nanodrop, et en fin stocker les échantillons à – 20°C.

Transcription inverse :

Ajouter 2µl Oligo dt (25µM chacun) /10µl ARN DNasé et puis incuber dans 5 minutes à 95°C. Et puis, ajouter 1µl H2O, 1µl MMLV-RT, 2µl dNTP (10mM chacun), 4µl buffer 5X, et puis incuber dans 60 minutes à 37°C, stocker les échantillons à – 20°C.

7. Préparation d'un gel d'électrophorèse et migration

Objet :

Migration et révélation d'acides nucléiques sur gel d'électrophorèse

Matériel :

Cuve (pour le gel), Peigne (pour les puits), Générateur de courantes électriques basses tensions continues, Cuve à électrophorèse, Plaque PCR ou tube PCR, Micropipette, Congélateur, Balance, Table à UV, Gants

Réactif chimique et biologique :

Agarose, TAE 1x, Kb ladder, Loading dye, BET 2.10^4

Contenu du mode opératoire protocole:

Préparation du gel d'agarose

Dissoudre la quantité d'agarose dans du TAE 1x, à la micro-onde : la quantité

8. PCR avec marqueurs microsatellite

Réactif chimique et biologique :

H_20 milli Q, dilution d'amorces à 10µM, dNTPmix 2 mM, enzyme Taq polymerase 5U/µl, green buffer 5 x contenant le MgCl2, ADN génomique. Contenu du mode opératoire protocole : Sur glace préparer un mix qui comprend par puit : H_20 qsp 20 µl, 2µL ADN

(moins de 5 ng), 1 µl primers F 10µM, 1 µL primer R 10 µM, 2 µl dNTPmix 2 mM, 0.2 µl Taq polymerase, 4 µl Green buffer 5 x

Programme PCR:

5 minutes à 95°c, cycle x 35 : 30 secondes à 95°c, 30 secondes à 55°c, 30 secondes à 72°c, 5 minutes à 72°c, infini 10°c, conserver la PCR à -20°c

9. PCR quantitative en temps réel (RT-PCR)

Matériel nécessaire :

Bac glace et glace, Pipette et cônes adaptés, Tubes 1,5 ml, Plaque 96 puits, Vortex, Centrifugeuse, LightCycler, Portoirs pour tube de 1,5ml, Lightcycler SYBR Green, H2O milli Q, Amorces des gènes ciblés (10µM), ADNc de l'échantillon sur lequel on souhaite doser les gènes ciblés.

Contenu du mode opératoire protocole

Diluer les primers : 1.2µM (300nM) soit 6µl d'amorce Foward (100µM) et 6µL d'amorce Revese (100µM) + 488µl H2O ultra pure.

Préparation mix pour 1 puit : 10 µl Buffer 2x SYBR Green, 2 µl H2O, 5 µl Amorce F+R. Vortexer et centrifuger le mix. Ditribuer le mix dans les puits, ensuite, distribuer 3µl ADNc dans chaque puits. Fermer la plaque avec le film adéquat. Vortexer et centrifuger la plaque pendant 30s; 1000 tours à 4°C.

Programme QPCR :

1er cycle > 5 minutes : 95°, 40 cycles > 30 secondes : 95°, > 30 secondes : 62° ou 60 °C selon les primers, > 40 secondes : 72°, Dernier cycle > 01 minute : 95°, > 30 secondes : 55°, > 30 secondes : 95°

10. Coloration de Magnaporthe oryzae dans cellule végétale

Inoculer les plantes avec au minimum 200 000 sp/mL pour augmenter les chances de voir des points de pénétration. Et puis, prélever les échantillons en tubes de 15 mL (environ 4 grandes feuilles), prélever la partie avec de la gélatine. Fixation à l'ETOH/Chloroforme (3 :1) + Acide acétique (0,15%) (1,5ml acide acétique+1000mlH2O), 1 nuit au moins, peux se conserver jusqu'à 48h, rinçage et conservation dans EtOH 70%.

Pour clarification, d'abord rinçage à H20 pendant 15 minutes. Incuber dans du NaOH 0,05 M, à 90°C, pendant 15 minutes, et puis rinçage à H20 pendant 10 minutes X 2fois. Incuber dans TrisHCl, à 90°C, pendant 30 minutes (le récupérer et le transférer en bouteille de récup car réutilisable), et puis rinçage à H20 pendant 10 minutes

Afin de marquage, découper les feuilles en morceaux de la taille 3-4cm. Incuber dans du calcofluor white 0,1% (1 mg/ml the use of 50% sodium hydroxide), pendant 15 minutes, à l'obscurité, temps ambiante. Récupérer le calcofluor à la fin car on le recycle. Rq : lorsqu'on prépare du calcofluor il se solubilise très mal. Pour aider la dissolution des cristaux, il est

possible d'ajouter un peu de NaOH 0,05M (5 mL pour 50 mL), et puis rinçage 30 minutes dans H2O. Incuber dans WGA 0,001% (dans PBS), 1 nuit, à l'obscurité, temps ambiante. On peut également le récupérer à la fin car on le recycle, et puis rinçage 30 minutes dans H2O. Conservation des échantillons dans ETOH 70% ou d'eau en attendant le montage

Pour observation au confocal, couper les morceaux de feuilles sur la lame. Ensuite, ajouter un peu de glycérol sur la lame. Déposer la lamelle et essuyer les coins de la lame. Passer sur le filtre 2 (bleu) pour voir le WGA. Comptage des événements: Prendre 3 ou 4 morceaux de feuille et compter au moins 100 événements (pour faire un %)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Amin KS, Venkatarao G (1979) Rice blast control by nitrogen management. Phytopathologische Zeitschrift 96:140-145

Andrews SS, Karlen DL, Cambardella CA (2004) The soil management assessment framework: A quantitative soil quality evaluation method. Soil Science Society of America Journal 68:1945-1962

Atkinson NJ, Urwin PE (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. J Exp Bot 63 (10):3523-3543. doi:10.1093/jxb/ers100

Ballini E, Morel J-B, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem J-L, Tharreau D (2008a) A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. Molecular Plant and Microbe Interaction 21 (0894-0282 (Print)):859-868

Ballini E, Morel J-B, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem J-L, Tharreau D (2008b) A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. Molecular Plant and Microbe Interaction 21:859-868

Ballini E, Vergne E, Tharreau D, Notteghem JL, Morel JB (2009) ARCHIPELAGO: towards bridging the gap between molecular and genetic information in rice blast disease resistance. Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease. Springer, Dordrecht

Bao-zhen L, MERRICK M, Su-mei L, Hong-ying L, Shu-wen Z, Wei-ming S, Yan-hua S (2009) Molecular Basis and Regulation of Ammonium Transporter in Rice. Rice Science 16 (4):314-322

Bastiaans L (1991) Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. Phytopathology 81 (6Cathy):611-615

Beatty PH, Shrawat AK, Carroll RT, Zhu T, Good AG (2009) Transcriptome analysis of nitrogen-efficient rice over-expressing alanine aminotransferase. Plant Biotechnology Journal 7 (6):562-576. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00424.x

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 (612):1139-1147

Bohnert HU, Fudal I, Dioh W, Tharreau D, Notteghem J-L, Lebrun M-H (2004) A Putative Polyketide Synthase/Peptide Synthetase from Magnaporthe grisea Signals Pathogen Attack to Resistant Rice. The Plant Cell 16:2499-2513. doi:10.1105/tpc.104.022715

Bolton MD (2009) Primary metabolism and plant defense—Fuel for the fire. Mol Plant-Microbe Interact 22 (5):487-497

Bolton MD, Thomma BPHJ (2008) The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. Physiological and Molecular Plant Pathology 72 (4-6):104-110

Bonman JM (1992) Durable resistance to rice blast disease - environmental influences. Euphytica 63:115-123

Bonman JM, Bandong JM, Lee YH, Lee EJ (1989) Race-specific partial resistance to blast in temperate japonica rice cultivars. Plant Disease 73 (6):496-499

Boyd LA, Ridout C, O'Sullivan DM, Leach JE, Leung H (2013) Plant pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. Trends in genetics : TIG 29 (4):233-240

Broadbent FE, De Datta SK, and Laureles EV (1987) Measurement of nitrogen utilization efficiency in rice genotypes. Agronomy Journal 79 (5):786-791

Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, and De Lorenzo G (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associted kinase 1(WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. Proc Natl Acad Sci USA 107:9452-9457

Cai HM, Lu YG, Xie WB, Zhu T, Lian XM (2012a) Transcriptome response to nitrogen starvation in rice. J Biosci 37 (4):731-747

Cai HM, Lu YG, Xie WB, Zhu T, Lian XM (2012b) Transcriptome response to nitrogen starvation in rice. . Journal of Biosciences 27:731-747. doi:10.1007/s12038-012-9242-2.

Camanes G, Pastor V, Cerezo M, Garcia-Andrade J, Vicedo B, Garcia-Agustin P, Flors V (2011) A Deletion in NRT2.1 Attenuates Pseudomonas syringae-Induced Hormonal Perturbation, Resulting in Primed Plant Defenses. Plant Physiology 158 (2):1054-1066. doi:10.1104/pp.111.184424

Camañes G, Victoria P, Cerezo M, García-Agustín P, Flors V (2012) A deletion in the nitrate high affinity transporter NRT2.1 alters metabolomic and transcriptomic responses to Pseudomonas syringae. Plant Signaling & Behavior 7 (6):619-622

Cao Y, Fan X-R, Sun S-B, Xu G-H, Hu J, Shen Q-R (2008) Effect of Nitrate on Activities and Transcript Levels of Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase in Rice. Pedosphere 18 (5):664-673. doi:Doi: 10.1016/s1002-0160(08)60061-2

Caplan J.L MP, Burch-Smith T.M, Czymmek K, and Dinesh-Kumar S.P (2008) Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. Cell 132 (3):449–462.

Cesari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, Jauneau A, Rivas S, Alaux L, Kanzaki H, Okuyama Y, Morel J-B, Fournier E, Tharreau D, Terauchi R, Kroj T (2013) The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. The Plant Cell Online

Chang TT (1984) Conservation of rice genetic resources : Luxury or necessity? Science 224 (4646):251-256

Chauhan RS, Farman ML, Zhang HB, Leong SA (2002) Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVR1-CO39* of *Magnaporthe grisea*. Molecular Genetics and Genomics 267 (5):603-612

Chen X, Ronald aPC (2011) Innate immunity in rice. Cell 16:451-459

Chen X, Shang J, Chen D, Lei C, Zou Y, Zhai W, Liu G, Xu J, Ling Z, Cao G, Ma B, Wang Y, Zhao X, Li S, Zhu L (2006) A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. Plant J 46 (5):794-804

Correa-Vitoria FJ, Zeigler RS (1994) Stability of partial and complete resistance in rice to Pyricularia grisea under rainfed upland conditions in eastern Colombia. Phytopathology Submitted

Coruzzi GM (2003) Primary N-assimilation into Amino Acids in Arabidopsis. In the Arabidopsis Book, Edited by Meyerowitz E, Somerville C,

. American Society of plant Biologists, Rockville, MD 31:1-17

Crawford NM, Wilkinson JQ, LaBrie ST (1992) Metabolic control of nitrate reduction in Arabidopsis thaliana. Aust J Plant Physiol

19:377-385

Cruz-Vazquez C, Ramos-Parra M, Vitela-Mendoza I, Garcia-Vazquez Z, Quintero-Martinez MT (2007) Relationships between stable fly infestation with some physical facility characteristics and sanitation practices in several dairy farms in the State of Aguascalientes, Mexico. Vet Parasitol 149 (3-4):246-250. doi:S0304-4017(07)00427-X [pii]

10.1016/j.vetpar.2007.08.020

Datnoff LE, (1994) Influence of mineral nutrition of rice on disease development. Edit par P. S. Teng, K.L. Hoeng and K. Moody Rice Pest Science and Management, IRRI 971

Dean R, Van Kan JAL, PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, DI PIETRO A, SPANU PD, RUDD JJ, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, G.D. F (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology MOLECULAR PLANT PATHOLOGY. doi:10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X

Debona D, Rodrigues FÁ, Rios JA, Nascimento KJT (2012) Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 102 (12):1121-1129

Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, Daniel-Vedele F (2012a) Characterization of the *Nrt2.6* gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. PLoS ONE 7 (8):e42491

Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, Daniel-Vedele F (2012b) Characterization of the Nrt2.6 gene in Arabidopsis thaliana: a link with plant response to biotic and abiotic stress. . PLoS ONE 7 (42-49). doi:10.1371/journal.pone.0042491.

Decreux A, Thomas A, Spies B, Brasseur R, Van Cutsem P, and Messiaen J (2006) In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. Phytochemistry

67:1068-1079

Delteil A, Blein M, Faivre-Rampant O, Guellim A, Estevan J, Hirsch J, Bevitori R, Michel C, Morel JB (2012) Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. Mol Plant Pathol 13 (1):72-82

Delteil A, Zhang J, Lessard P, Morel J-B (2010) Potential candidate genes for improving rice disease resistance. Rice 3 (1):56-71

Dievart A, Clark SE (2003) Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. Current Opinion in Plant Biology Curr Opin Plant Biol 6 (529):507-516

Divon HH, Ziv C, Davydov O, Yarden O, Fluhr R (2006) The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during Fusarium oxysporum pathogenesis. Molecular Plant Pathology 7 (6):485-497. doi:10.1111/j.1364-3703.2006.00354.x

Dodds PN RJ (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. Nat Rev Mol Cell Biol 11:540-548

Donofrio NM, Oh Y, Lundy R, Pan H, Brown DE, Jeong JS, Coughlan S, Mitchell TK, Dean RA (2006) Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Fungal Genetics and Biology 43 (9):605-617

Dordas C (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. Agronomy for Sustainable Development 28 (1):33-46

Dulermo T, Bligny R, Gout E, Cotton P (2009) Amino acid changes during sunflower infection by the necrotrophic fungus B. cinerea. Plant Signal Behav 4:859-861

Dusserrea J, Choparta J, L, Douzeta J, M, Rakotoarisoab J, Scopela E (2012) Upland rice production under conservation agriculture cropping systems in cold conditions of tropical highlands. Field Crops Research 138:33-41

Faivre-Rampant O, Thomas J, Allègre M, Morel J-B, Tharreau D, Nottéghem J-L, Lebrun M-H, Schaffrath U, Piffanelli P (2008) Characterization of the model system rice–Magnaporthe for the study of nonhost resistance in cereals. New Phytologist 180 (4):899-910

Filippi MC, Prabhu AS (1998) Relationship between panicle blast severity and mineral nutrient content of plant tissue in upland rice. . Journal of Plant Nutrition 21:1577-1587

Fisher HF (1985) l-glutamate dehydrogenase from bovine liver. . Methods Enzymol 113:16-27

Forde BG, Lea PJ (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. Journal of Experimental Botany 58 (9):2339-2358

Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, Yano M (2009) Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. Science 325 (5943):998-1001. doi:10.1126/science.1175550

Good AR, Shrawat AK, and Muench DG (2004) Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production. Trands plant Sci 9 (12):597-603

Greenberg JT, Yao N (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00361.x. Cellular Microbiology 6 (3):201-211

Gregersen PL, Holm PB (2007) Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (Triticum aestivum L.). Plant Biotechnology Journal 5 (1):192-206

Gupta KJ, Brotman Y, Segu S, Zeier T, Zeier J, Persijn ST, Cristescu SM, Harren FJM, Bauwe H, Fernie AR, Kaiser WM, Mur LAJ (2013) The form of nitrogen nutrition affects resistance against Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in tobacco. Journal of Experimental Botany 64 (2):553-568

Hammond-Kosack K.E KK (2007) Resistance Genes (R Genes) in Plants. In Encyclopedia of lice science, UK. doi:DOI: 10.1002/9780470015902.a0020119

Harrison J, Brugiere N, Phillipson B, Ferrario-Mery S, Becker T, Limami MA, Hirel B, (2000) Manipulating the pathway of ammonia assimilation through genetic engineering and breeding. Consequences on plant physiology and plant development. Plant Soil 221:81-93

Hayasaka T, Fujii H, Ishiguro K (2008) The role of silicon in preventing appressorial penetration by the rice blast fungus. Phytopathology 98 (9):1038-1044

Hirel B, Lea PJ (2001) Ammonium assimilation. In: Lea PJ, MorotGaudry JF, eds. Plant nitrogen Berlin: Springer-Verlag, :79–99.

Horowitz S, Freeman S, Zveibil A, Yarden O (2006) A defect innir1, a nirA-like transcription factor, confers morphological abnormalities and loss of pathogenicity in Colletotrichum acutatum. . Mol Plant Pathol 7:341–354.

Howard D, Chambers AY, Logan J (1994) Nitrogen and fungicide effects on yield components and disease severity in wheat. Journal of production agriculture 7:448-454

Hua L, Wu J, Chen C, Wu W, He X, Lin F, Wang L, Ashikawa I, Matsumoto T, Pan Q (2012a) The isolation of *Pi1*, an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. Theor Appl Genet. doi:10.1007/s00122-012-1894-7

Hua L, Wu J, Chen C, Wu W, He X, Lin F, Wang L, Ashikawa I, Matsumoto T, Wang L, Pan Q (2012b) The isolation of *Pi1*, an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. Theor Appl Genet 125 (5):1047-1055. doi:10.1007/s00122-012-1894-7

Huang X, Wei X, Sang T, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, Li C, Zhu C, Lu T, Zhang Z, Li M, Fan D, Guo Y, Wang A, Wang L, Deng L, Li W, Lu Y, Weng Q, Liu K, Huang T, Zhou T, Jing Y, Li W, Lin Z, Buckler ES, Qian Q, Zhang Q-F, Li J, Han B (2010) Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. Nat Genet 42 (11):961-967

Inanaga S, Okasaka, A., and Tanaka, S. (1995) Does silicon exist in association with organic compounds in rice plant? Jpn J Soil Sci Plant Nutr 11:111-117.

International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. Nature 436 (7052):793-800

Inthapanya P, Sipaseuth, Sihavong P, et al. (2000) Genotype differences in nutrient uptake and utilisation for grain yield production of rainfed lowland rice under fertilised and non-fertilised conditions. . Field Crops Research 65 (1):57-68

Ishiguro K, Takechi S, Hashimoto A (1992) Behavior of tricyclazole residue on rice leaves and its efficacy for rice leaf blast control in the field. Ann Phytopath Soc Japan 58Cathy:259-266

Jiang C.J, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Yazawa K, Yoshida R, Inoue H, Hayashi N, Sakakibara H, H T (2010) Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-Magnaporthe grisea interaction. Mol Plant Microbe Interact 23:791-798

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444 (7117):323-329

Kaku H NY, Minami N I, Tomiyama CA, Dohmae N, Takio K,, and Minami E, Shibuya N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. . The National Academy of Sciences of the USA 103:11086–11091.

Kang S, Sweigard JA, Valent B (1995) The PWL host specificity gene family in the blast fungus Magnaporthe grisea. MPMI 8 (6JLN-1038):939-948

Kato H (1974) Epidemiology of rice blast disease. Review Plant Prot Research 7JLN-103, KATO-2:1-20

Katsube T, Koshimizu Y (1970) Influence of blast disease on harvests in Rice plant. 1. Effects of panicle infection on yield components and quality. Bull Tohoku Nat Agric Exp Station 39Cathy:55-96

Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Urnemura K, Urnezawa T, Shimamoto K (2006) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. Proc Natl Acad Sci U S A 103 (1):230-235

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

Kishimoto K KY, Kaku H, Shibuya N, Minami E and Nishizawa Y (2011) Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus Magnaporthe oryzae in rice. The Plant Journal 64:343–354

Kohli MM, Mehta YR, Guzman E, De Viedma L, Cubilla LE (2011) Pyricularia Blast – a threat to wheat cultivation. Czech Journal of Genetic and Plant Breeding 47 (Special Issue):S130-S134

Konishi H, Ishiguro K, Komatsu S (2001a) A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. Proteomics 1 (9):1162-1171

Konishi H, Ishiguro K, Komatsu S (2001b) A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. Proteomics 1:1162-1171.

Koutroubas S, Ntanos DA (2003a) Genotypic differences for grain yield and nitrogen utilization in Indica and Japonica rice under Mediterranean conditions. Field Crops Research 83 (3):251-260

Koutroubas SD, Ntanos DA (2003b) Genotypic differences for grain yield and nitrogen utilization in Indica and Japonica rice under Mediterranean conditions. Field Crops Research 83 (3):251-260. doi:10.1016/s0378-4290(03)00067-4

Kuerschner E, Bonman JM, Garrity DP, Tamisin MM, Pabale D, Estrada BA (1992) Effects of nitrogen timing and split application on blast disease in upland rice. Plant Disease 76 (4):384-389

Lacharme M (2001) La fertilisation minérale du riz. Mémento Technique de Riziculture, Ministère du Développement Rural et de l'Environnement

Direction de la Recherche Formation Vulgarisation:1-17

Larmande P, Gay C, Lorieux M, Périn C, Bouniol M, Droc G, Sallaud C, Perez P, Barnola I, Biderre-Petit C, Martin J, Morel JB, Johnson AAT, Bourgis F, Ghesquière A, Ruiz M, Courtois B, Guiderdoni E (2008) Oryza Tag Line, a phenotypic mutant database for the Génoplante rice insertion line library. Nucleic Acids Research 36 (suppl 1):D1022-D1027

Lau GKK, Hamer JE (1996) Regulatory genes controlling MPG1 expression and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 8 (5):771-781. doi:10.2307/3870280

Le Gouis J, Béghin D, Heumez E, Pluchard P (2000) Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. European Journal of Agronomy 12 (3–4):163-173

Lea PJ, Azevedo RA (2007) Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. Annals of Applied Biology 151 (3):269-275. doi:10.1111/j.1744-7348.2007.00200.x

Legouis J, Beghin D, Heumez E, Pluchard P (2000) Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. European Journal of Agronomy 12:163-173

Li B, Xin W, Sun S, Shen Q, Xu G (2006) Physiological and Molecular Responses of Nitrogen-starved Rice Plants to Re-supply of Different Nitrogen Sources. Plant and Soil 287 (1-2):145-159. doi:10.1007/s11104-006-9051-1

Li H, Zhou, S Y, Zhao, W S, Su, S C, and Peng YL (2008) A novel wall-associated receptor like protein kinase gene, OsWAK1, play important roles in rice blast desease resistance. Plant Molecular Biology 69:337-346

Li M, Sun P, Zhou H, Chen S, Yu S (2011) Identification of quantitative trait loci associated with germination using chromosome segment substitution lines of rice (Oryza sativa L.). Theor Appl Genet 123:411-420

Li W, Wang B, Wu J, Lu G, Hu Y, Zhang X, Zhang Z, Zhao Q, Feng Q, Zhang H, Wang Z, Wang GL, B. Han, Wang Z, Zhou B (2009) The Magnaporthe oryzae avirulence gene AvrPiz-t encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene Piz-t

Mol Plant Microbe Interact

22:411-420
Lian X, Wang S, Zhang J, Feng Q, Zhang L, Fan D, Li X, Yuan D, Han B, Zhang Q (2006) Expression profiles of 10,422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assayed using a cDNA microarray. Plant Molecular Biology 60 (5):617-631
Lin J-F, Wu S-H (2004) Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. The Plant Journal 39 (4):612-628
Liu Q (2006) Computational identification and systematic analysis of the ACR gene family in Oryza sativa. Journal of Plant Physiology 163 (4):445-451. doi:10.1016/j.jplph.2005.05.011
Long DH, Lee FN, TeBeest DO (2000a) Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. Plant Disease 84 (4):403-409
Long DH, Lee FN, TeBeest DO (2000b) Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. Plant Disease 84:403-409
Loque D, Lalonde S, Looger LL, von Wire´ n N, Frommer WB (2007) A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. Nature 446:195–198.
Loque D, Von Wiren N (2004) Regulatory levels for transport of ammonium in plant roots. J Exp Bot 55:1293–1305
Lu Y, Luo F, Yang M, Li X, Lian X (2011) Suppression of glutamate synthase genes significantly affects carbon and nitrogen metabolism in rice (Oryza sativa L.). Science China Life Sciences 54 (7):651-663. doi:10.1007/s11427-011-4191-9
Macadam JW, Volenec JJ, Nelson CJ (1989) Effects of nitrogen on mesophyll cell-division and epidermal-cell elongation in tall fescue leaf blades. . Plant Physiology 89:549-556
Maekawa S, Sato T, Asada Y, Yasuda S, Yoshida M, Chiba Y, Yamaguchi J (2012a) The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon/nitrogen response. Plant Molecular Biology 79 (3):217-227
Maekawa S, Sato T, Asada Y, Yasuda S, Yoshida M, Chiba Y, Yamaguchi J (2012b) The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon/nitrogen response. . Plant Molecular Biology 79:217-227. doi:10.1007/s11103-012-9907-0.
Marschner H (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed Academic Press, London, UK
Mathioni SM, Beló A, Rizzo CJ, Dean RA, Donofrio NM (2011) Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and in vitro stresses. BMC Genomics 12 (1):49
Matsuyama N (1975) The effect of ample nitrogen fertilizer on cell-wall materials and its significance to rice blast disease. Annals of the Phytopathological Society of Japan 41 (1):56-61
Matsuyama N, Dimond AE (1973) Effect of nitrogenous fertilizer on biochemical processes that could affect lesion size of rice blast. Phytopathology 63 (9):1202-1203
McNally KL, Childs KL, Bohnert R, Davidson RM, Zhao K, Ulat VJ, Zeller G, Clark RM, Hoen DR, Bureau TE, Stokowski R, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR, Padhukasahasram B, Bustamante CD, Weigel D, Mackill DJ, Bruskiewich RM, Rätsch G, Buell CR, Leung H, Leach JE (2009) Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.0900992106
Mei C, Qi M, Sheng G, Y Y (2006) Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. Mol Plant Microbe Interact 19:1127-1137
Mentlak TA. NJT, Kroi T (2011) Effector Translocation and Delivery by the Rice Blast Fungus Magnaporthe oryzae Effectors in Plant-Microbe Interactions Oxford, UK
Miflin B.J. HDZ (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. J Exp Bot 93:979–987
Morot-Gaudry JF, Améziane, R., AuTran, J.C., Bénétrix, F., Boucaud, J. (1997) Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA Paris
Mukherjee AK, Mohapatra NK, Rao AVS, Nayak P (2005a) Effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-blasting resistance in rice. J Agric Sci 143:385-393
Mukherjee AK, Mohapatra NK, Rao AVS, Nayak P (2005b) Effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-blasting resistance in rice. . Journal of Agricultural Science 143:385-393.

Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, S. Y (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice

Plant J 33:887–898

Namai S, Toriyama K, Fukuta Y (2009) Genetic variation in dry matter production and physiological nitrogen use efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Breeding Science 59:269-276

Obara M, Sato T, Yamaya T (2000) High content of cytosolic glutamine synthetase does not accompany a high activity of the enzyme in rice (Oryza sativa) leaves of indica cultivars. Physiologia Plantarum 108 (1):11-18

Okuyama Y, Kanzaki H, Abe A, Yoshida K, Tamiru M, Saitoh H, Fujibe T, Matsumura H, Shenton M, Galam DC, Undan J, Ito A, Sone T, Terauchi R (2011) A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. Plant J 66 (3):467-479

Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B (2000) A Telomeric Avirulence Gene Determines Efficacy for the Rice Blast Resistance Gene Pi-ta. American Society of Plant Physiologists 12 (11):2019-2032

Otani Y (1959) Studies on the relation between the principal components of the rice plant and its susceptibility to the blast disease, 3. Annals of the Phytopathological Society of Japan 16:97-102

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

Ou SH (1972) Studies on stable resistance to rice blast disease. Rice Breeding:227-237

Parker D, Beckmann M, Zubair H, Enot DP, Caracuel-Rios Z, Overy DP, Snowdon S, Talbot NJ, Draper J (2009) Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. The Plant Journal 59 (5):723-737. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03912.x

Parlevliet JE, van Ommeren A (1975) Partial resistance of barley to leaf rust Puccinia hordei. II. Relationship between field trials micro plot tests and latent period. Euphytica 24:293-303

Pathak RR, Aunila Admad AL, Mandula R (2008) Molecualar physiology of plant nitrogen use efficiency and biotechnological options forits enhancement, . Curent science 94 (11)

Peng M, Bi Y-M, Zhu T, Rothstein SJ (2007) Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. Plant Molecular Biology 65 (6):775-797. doi:10.1007/s11103-007-9241-0

Peng M, Hudson D, Schofield A, Tsao R, Yang R, Gu H, Bi YM, Rothstein SJ (2008) Adaptation of Arabidopsis to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. Journal of Experimental Botany 59 (11):2933-2944. doi:10.1093/jxb/ern148

Perez-Garcia A, Canovas FM, Gallardo F, Hirel B, Devicente A (1995) Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with Pseudomonas syringae pv. tomato. Mol Plant-Microbe Interact 8:956-103

Postel S Kb (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. Seminars in Cell & Developmental Biology 20: 1025-1031.

Prabhu AS, Filippi MC, Zimmermann FJP (1996) Genetic control of blast in relation to nitrogen fertilization in upland rice. Pesqui Agropecu Bras 31 (5):339-347

Quraishi UM, Abrouk M, Murat F, Pont C, Foucrier S, Desmaizieres G, Confolent C, Rivière N, Charmet G, Paux E, Murigneux A, Guerreiro L, Lafarge S, Le Gouis J, Feuillet C, Salse J (2011) Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-metaQTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution. The Plant Journal 65 (5):745-756

Ribot C, Cesari S, Abidi I, Chalvon V, Bournaud C, Vallet J, Lebrun MH, Morel JB, Krij T (2012) The Magnaporthe oryzae effector AVR1-CO39 is translocated into rice cells independantly of a fungal -derived machinery. the plant journal

Ribot C, Hirsch J, Balzergue S, Tharreau D, Nottéghem J-L, Lebrun M-H, Morel J-B (2008) Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Journal of Plant Physiology 165 (1):114-124

Robinson PW, Hodges CF (1981) Nitrogen-Induced Changes in the Sugars and Amino Acids of Sequentially Senescing Leaves of Poa pratensis and Pathogenesis by Drechslera sorokinian1). Journal of Phytopathology 101 (4):348-361. doi:10.1111/j.1439-0434.1981.tb03355.x

Robinson RA (1980) New concepts in breeding for disease resistance. Ann Rev Phytopathol 18:189-210

Römheld V, Marschner H (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant Physiol 80:175-180

Roumen EC (1994) A strategy for accumulating genes for partial resistance to blast disease in rice within a conventional breeding program. In: Zeigler R, Leong S, Teng P (eds) International Symposium on rice blast disease. CAB International/IRRI, Madison, USA, pp 245-265

Samonte SOPB, Wilson LT, Medley JC, Pinson SRM, McClung AM, Lales JS (2006) Nitrogen Utilization Efficiency. Agronomy Journal 98 (1):168. doi:10.2134/agronj2005.0180

Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O., Udvard iMK, M. S (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. Plant Physiology 136:2483-2499. doi:10.1104/pp.104.047019.

Seifi HS, Van Bockhaven J, Angenon G, Höfte M (2013) Glutamate metabolism in plant disease and defense: friend or foe? Mol Plant-Microbe Interact 26 (5):475-485

Sharma T, Rai A, Gupta S, Vijayan J, Devanna B, Ray S (2012) Rice blast management through host-plant resistance: retrospect and prospects. Agricultural Research 1 (1):37-52. doi:10.1007/s40003-011-0003-5

Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H, Shibuya N (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. The Plant Journal 64 (2):204-214. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04324.x

Shirsekar G, Dai L, Hu Y, Wang X, Zeng L, Wang G-L (2010) Role of Ubiquitination in Plant Innate Immunity and Pathogen Virulence. . Journal of Plant Biology 53 (10-18). doi:10.1007/s12374-009-9087-x.

Silva-Lobo VL, Filippi MCC, Silva GB, Venancio WL, Prabhu AS (2012) Relação entre o teor de clorofila nas folhas e a severidade de brusone nas panículas em arroz de terras altas. . Tropical Plant Pathology 37:83-87.

Smith JR, Leong SA (1994) Mapping of a Magnaporthe grisea locus affecting rice (Oryza sativa) cultivar specificity. Theor Appl Genet 88:901-908

Solomon P, Lee R, Wilson T, Oliver R (2004) Pathogenicity of Stagonospora nodorum requires malate synthase. Mol Microbiol 53:1065–1073.

Solomon PS, Tan K-C, Oliver RP (2003) The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. Molecular Plant Pathology 4 (3):203-210

Suzuki H (1974) Behavior of rice blast fungus spore and application to outbreak forecast of rice blast disease. Japanese Agricultural Research Quarterly 8 (2):78-83

Sweigard JA, Carroll AM, Kang S, Farrall L, Chumley FG, Valent B (1995) Identification, cloning, and characterisation of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. The Plant Cell 7:1221-1233

Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T (2007) Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (Oryza sativa L.). Journal of Experimental Botany 58 (9):2319-2327

Talbot NJ, McCafferty HRK, Ma M, Moore K, Hamer JE (1997) Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. Physiological and Molecular Plant Pathology 50 (3):179-195

Talukder ZI, McDonald AJS, Price AH (2005a) Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL x environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. New Phytologist 168 (2):455-464

Talukder ZI, McDonald AJS, Price AH (2005b) Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL × environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. New Phytologist 168 (2):455-464

Tanaka I (1961) Analytical studies on the environmental conditions related to epidemics of rice blast disease in Hokkaido. Hokkaido Nat Agr Exp Station 55:1-58

Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Lauge R, Reisdorf-Cren M, Langin T, Masclaux-Daubresse C (2007) The plant nitrogen mobilization promoted by Colletotrichum lindemuthianum in Phaseolus leaves depends on fungus pathogenicity. Journal of Experimental Botany 58 (12):3351-3360. doi:10.1093/jxb/erm182

Telebanco-Yanoria M, Koide Y, Fukuta Y, Imbe T, Tsunematsu H, Kato H, Ebron L, Nguyen T, Kobayashi N (2011) A set of near-isogenic lines of Indica-type rice variety CO 39 as differential varieties for blast resistance. Molecular Breeding 27 (3):357-373

Teng PS, Klein-Gebbinck HW, Pinnschmidt H (1991) An analysis of the blast pathosystem to guide modeling and forecasting. In: Rice blast modelling and forecasting. International Rice Research Institute, Los Ba&#65533;os, The Philippines, pp 1-30

Thomas S, Rasmussen S, Glaring M, Rouster J, Christiansen S, Oliver R (2001) Gene identification in the obligate fungal pathogen Blumeria graminis by expressed sequence tag analysis. . Fungal Genet Biol 33:195–211.

Tirol-Padre A, Ladha JK, Singh U, et al. (1996) Grain yield performance of rice genotypes at suboptimal levels of soil N as affected by N uptake and utilization efficiency. . Field Crops Research 46:127-143

Valent B (1990) Rice blast as a model system for plant pathology. Phytopathology 80 (1JLN-321):33-36

Valent B, Khang CH (2010) Recent advances in rice blast effector research. Curr Opin Plant Biol 13 (4):434-441. doi:10.1016/j.pbi.2010.04.012

Van Loon L.C. VEA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55:85-97

Van Loon LC, Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. In Annual Review of Phytopathology (Palo Alto: Annual Reviews):135-162

Vergne E (2007) Analyse des systèmes inductibles et préformés de défense du riz à Magnaporthe oryzae au travers de l'expression de gènes. Thèse:367 pages

Vergne E, Ballini E, Droc G, Tharreau D, Notteghem JL, Morel JB (2008) ARCHIPELAGO: A dedicated resource for exploiting past, present, and future genomic data on disease resistance regulation in rice. Mol Plant-Microbe Interact 21 (7):869-878

Vergne E, Grand X, Ballini E, Chalvon V, Saindrenan P, Tharreau D, Notteghem JL, Morel JB (2010) Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen Magnaporthe oryzae. BMC Plant Biol 10:206

Volk RJ, Kahn RP, Weintraub RL (1958) Silicon content of the rice plant as a factor influencing its resistance to infection by the blast fungus Piricularia oryzae. Phytopathology 48INFMIL-4:179-184

Walters DR, Bingham IJ (2007) Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. Annals of Applied Biology 151 (3):307-324. doi:10.1111/j.1744-7348.2007.00176.x

Wan J. ZXCaSG (2008) Chitin signaling and plant disease resistance. Plant Signaling & Behavior 3:10:831-833

Wan XY, Wan JM, Jiang L, Wang JK, Zhai HQ, Weng JF, Wang HL, Lei CL, Wang JL, Zhang X, Cheng ZJ, Guo XP (2006) QTL analysis for rice grain length and fine mapping of an identified QTL with stable and major effects. Theor Appl Genet 112 (7):1258-1270

Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ (1994a) RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421-1434

Wang H, Lu Y, Liu P, Wen W, Zhang J, Ge X, Xia Y (2013) The ammonium/nitrate ratio is an input signal in the temperature-modulated, SNC1-mediated and EDS1-dependent autoimmunity of nudt6-2 nudt7 the plant journal 73:265-273

Wang MY, Class ADM, Shaff JE, Kochian LV (1994b) Ammonium Uptake by Rice Roots. Plant Physiol 104: 899-906

Wang WH, Köhler B, Cao FQ, Liu, G.W,, Gong YY, Sheng S, Song QC, Cheng XY, Garnett T, Okamoto M, Qin R, Mueller-Roeber B, Tester M, Liu LH (2012) Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in Arabidopsis. New Phytol 193 (432-44). doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03929

Wang Y, Wu J, Park ZY, Kim SG, Rakwal R, Agrawal GK, Kim ST, Kang KY (2011) Comparative secretome investigation of *Magnaporthe oryzae* proteins responsive to nitrogen starvation. Journal of Proteome Research 10 (7):3136-3148

Wilson RA, Fernandez J, Quispe CF, Gradnigo J, Seng A, Moriyama E, Wright JD (2012) Towards defining nutrient conditions encountered by the rice blast fungus during host infection. PLoS ONE 7 (10):e47392

Wilson RA, Jenkinson JM, Gibson RP, Littlechild JA, Wang ZY, Talbot NJ (2007) Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. Embo J 26 (15):3673-3685. doi:10.1038/sj.emboj.7601795

Wilson RA, Talbot NJ (2009) Under pressure: investigating the biology of plant infection by Magnaporthe oryzae. Nat Rev Microbiol 7:185–195.

Xiong L, Yang Y (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. Plant Cell 15 (3):745-759

Xu G, Fan X, Miller AJ (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annual Review of Plant Biology 63 (1):153-182

Yaeno T, Iba K (2008) BAH1/NLA, a RING-Type Ubiquitin E3 Ligase, Regulates the Accumulation of Salicylic Acid and Immune Responses to Pseudomonas syringae DC3000. Plant Physiology 148 (2):1032-1041. doi:10.1104/pp.108.124529

Yamaya T, Obara M, Nakajima H, Sasaki S, Hayakawa T, Sato T (2002) Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. Journal of Experimental Botany 53:917-925

Yang F, Jensen JD, Spliid NH, Svensson B, Jacobsen S, Jørgensen LN, Jørgensen HJL, Collinge DB, Finnie C (2010) Investigation of the effect of nitrogen on severity of Fusarium Head Blight in barley. Journal of Proteomics 73 (4):743-752

Ye G, Liang S, Wan J (2010) QTL mapping of protein content in rice using single chromosome segment substitution lines. Theor Appl Genet 121:740-750

Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J, Kamoun S, Terauchi R (2009) Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. The Plant Cell Online 21 (5):1573-1591. doi:10.1105/tpc.109.066324

Zhang LY, Bernard M, Leroy P, Feuillet C, Sourdille P (2005) High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. Theor Appl Genet 111 (4):677-687

Zhang Y, Dickinson JR, Paul MJ, Halford NG (2003) Molecular cloning of an arabidopsis homologue of GCN2, a protein kinase involved in co-ordinated response to amino acid starvation. Planta 217 (4):668-675. doi:10.1007/s00425-003-1025-4

Zhao K, Tung C-W, Eizenga GC, Wright MH, Ali ML, Price AH, Norton GJ, Islam MR, Reynolds A, Mezey J, McClung AM, Bustamante CD, McCouch SR (2011) Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. Nat Commun 2:467

Zhao X-Q, Shi W-M (2006) Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (Oryza sativa) seedlings. Plant Sci 170 (4):748-754. doi:10.1016/j.plantsci.2005.11.006

Zhou B, Qu SH, Liu GF, Dolan M, Sakai H, Lu GD, Bellizzi M, Wang GL (2006) The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between Pi2 and Piz-t resistance proteins

determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. Mol Plant-Microbe Interact 19 (11):1216-1228

Zhou JH, Wang JL, Xu JC, Lei CL, Ling ZZ (2004) Identification and mapping of a rice blast resistance gene Pi-g(t) in the cultivar Guangchangzhan. Plant Pathology 53 (2):191-196

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. Cell 125 (4):749-760

RESUME

Le cas de l'interaction modèle entre le riz et le champignon pathogèneMagnaporthe oryzae a été étudié afin de mieux comprendre les effets d'une pratique culturale, la fertilisation azotée, sur la résistance. Ce travail a permis de mettre au point un système simplifié permettant d'étudier au laboratoire l'augmentation de la sensibilité induite par l'apport azoté, un phénomène dénommé NIS (Nitrogen-Induced Susceptibility), d'analyser les effets de l'azote sur la croissance de M. oryzae et son pouvoir pathogène, d'explorer les effets de l'azote au travers de la diversité du riz et des différents types de résistance (complètes et partielles), et d'identifier par cartographie des zones du génome du riz importantes pour la NIS. L'expression des gènes de défenses ne semble pas altérée en cas de régime riche en azote. Au contraire, le suivi cytologique de l'infection par M. oryzae a mis évidence que la pénétration du champignon n'était pas modifiée par la présence d'azote alors que sa croissance dans la plante est accrue. Le niveau de maladie a pu être augmenté par apport d'acides aminés 24h après le début de l'infection, suggérant qu'une relation trophique est probablement à la base de la NIS.

Une analyse de l'effet de l'azote sur la sensibilité à la pyriculariose à travers la diversité du riz nous a permis de mieux caractériser la diversité du phénomène de NIS. La NIS est très polymorphe mais n'est pas corrélée à la différence liée aux sous-groupes indica et japonica du riz. Par ailleurs, un fort apport en azote a réduit la résistance déclenchée par le gène de résistance Pi1, suggérant que la robustesse de ces gènes peut être affectée par la NIS. Enfin, un locus qui contrôle la sensibilité du riz à la pyriculariose sous un régime riche en azote a été identifié sur le chromosome 1. Plusieurs éléments suggèrent un lien possible entre l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) et la NIS.

ABSTRACT

Nitrogen-Induced Susceptibility (NIS) to plant diseases is a widespread phenomenon. In this work, we set an experimental system in which nitrogen supply strongly affects rice blast susceptibility whereas it is only slightly perturbing plant growth. We show that fungal growth is affected before and after penetration in the plant but that the final penetration rate is not affected; thus a change in penetration is not responsible for increased susceptibility. Differences in total nitrogen amount and defense gene expression before infection are unlikely to be responsible for the observed increase in penetration. After penetration, small changes in plant growth, but not modifications of the transcriptional regulation of defense genes, could be responsible for nitrogen-induced susceptibility. On the other hand, the fungus seems to perceive small differences in nitrogen amount after penetration and this may explain enhanced growth under high nitrogen regime. Indeed, exogenous treatment with some free amino acids after inoculation mimicked Nitrogen-Induced Susceptibility, further arguing that this phenomenon is mostly due to a trophic relation between the plant and the fungus.

We also used our experimental system that does not strongly affect plant development to address the question of NIS polymorphism across rice diversity. We show that the capacity of rice to display NIS is highly polymorphic and does not correlate with difference related to indica/japonica sub-groups. We also tested the robustness of three different major resistance genes under high nitrogen. Nitrogen partially breaks down resistance triggered by the Pi1 gene. Cytological examination indicates that penetration rate is not affected by high nitrogen whereas growth of the fungus is increased inside the plant. Using the CSSL mapping population between Nipponbare and Kasalath, we identified a Kasalath locus on chromosome 1, called NIS1, which dominantly increases susceptibility under high nitrogen. We discuss the possible relationships between Nitrogen Use Efficiency (NUE), disease resistance regulation and NIS. This work provides evidences that robust forms of partial resistance exist across diversity and can be genetically mapped. This work also suggests that under certain environmental circumstances, complete resistance may breakdown, irrelevantly of the capacity of the fungus to mutate. These aspects should be considered while breeding for robust forms of resistance to blast disease.