

Génomique et biotechnologie pour l'amélioration de l'utilisation de l'azote et de l'eau

Georges PELLETIER

Institut Jean-Pierre Bourgin,
INRA, Route de Saint Cyr,
Versailles 78026 Cedex, France
<pelletie@versailles.inra.fr>

Abstract: Water and nitrogen are essential factors for crop productivity and their availability for agriculture could be reduced because of foreseen demographic, economic and climatic evolutions. Plant breeding has the potential to increase crops' nitrogen and water use efficiency in order to reduce their needs. Molecular markers linked to favourable genes derived from plant genomics programs can be used to combine them into cultivars through marker-assisted selection. The knowledge of the function of the genes makes the modification of their regulation possible through genetic engineering and their introduction by transgenesis in the plant genome in order to alleviate the effect of various stress. In this domain basic research on the molecular mechanisms involved and crop improvement efforts are progressing together. Some examples are presented illustrating strategies and outcomes for better use of water and nitrogen in model species (tobacco, *Arabidopsis*...) as well as in crops (rice, maize, rapeseed...).

Key words: nitrogen, water deficit, biotechnology, plant breeding, transgenesis

L'eau et l'azote sont des facteurs essentiels de la productivité des cultures.

En fait, près de 50 % des sols cultivés dans le monde ont une faible disponibilité en eau et seulement 15 % n'exercent pas de contraintes physico-chimiques particulières sur les plantes [1]. D'après l'International Water Management Institute [2] l'agriculture, l'élevage et l'aquaculture qui utilisent actuellement plus de 7 100 km³ d'eau par an, dont 2 200 dans des zones irriguées, devraient, pour subvenir aux besoins de la population mondiale en croissance, pratiquement doubler leur consommation d'ici 2050 si aucune amélioration de la gestion de l'eau n'intervenait d'ici là. Par ailleurs la répartition de la disponibilité en l'eau pourrait se trouver modifiée par l'évolution climatique [3]. L'amélioration de cette gestion passe par des investissements pour l'accès à la ressource et pour sa distribution et par une amélioration des pratiques agricoles. Parmi ces dernières on peut ranger le choix de variétés végétales plus économes en eau ou capables de surmonter des épisodes de déficit hydrique.

On estime qu'environ 50 % de l'azote fourni au champ n'est pas directement utilisé par les cultures qui les reçoivent ni retenu par la matière organique du sol et se retrouve donc soit émis sous forme de gaz à fort potentiel d'effet de serre comme le N₂O, soit perdu par lessivage et accumulés dans les eaux souterraines contribuant à l'eutrophisation de certains milieux aquatiques. Les engrais azotés sont responsables depuis leur production jusqu'à leur

utilisation, d'environ un tiers des émissions de gaz à effet de serre du secteur agricole dans le monde [4]. Les préoccupations environnementales auxquelles s'ajoute le coût croissant de l'énergie conduisent à réduire les intrants agricoles. Pour maintenir la production on peut se tourner vers l'amélioration des pratiques culturales comme par exemple l'agriculture de précision. L'amélioration génétique est aussi de nature à proposer des variétés plus adaptées à une gestion parcimonieuse de cet élément.

Dans un cas comme dans l'autre il faut donc s'attendre à une limitation de la production agricole si des solutions techniques ne sont pas élaborées et mises en œuvre.

La génomique végétale est entrée dans l'ère de l'analyse fonctionnelle des gènes en s'appuyant sur les séquences des génomes, des collections de mutants induits et sur la variabilité naturelle de certaines espèces sauvages comme *Arabidopsis thaliana* ou cultivées comme le riz ou le maïs. Ces ressources génétiques permettent grâce à des outils d'analyse sophistiqués, d'associer un gène à une fonction physiologique et *in fine* à un caractère agronomique. Cette connaissance est utilisée soit en sélection de type conventionnel perfectionnée par la possibilité de suivre les régions d'intérêt du génome à l'aide de marqueurs moléculaires (sélection assistée par marqueurs ou SAM), soit pour modifier par génie génétique certains gènes qui sont ensuite introduits par transgène.

On peut déjà illustrer sur quelques exemples les stratégies et les résultats obtenus pour une meilleure utilisation de l'eau et de l'azote, sachant que la recherche sur la compréhension des mécanismes et les tentatives d'amélioration progressent en même temps.

Biotechnologie et gestion de l'azote minéral

L'assimilation de l'azote minéral (ammonium ou nitrate), essentielle pour la croissance et le développement de la plante, commence par la conversion en glutamine et glutamate par 2 enzymes, la glutamine synthase et la glutamate synthase qui drainent le flux d'azote pour l'ensemble des composés azotés de l'organisme, les autres acides aminés, les nucléotides, la chlorophylle, etc. [5].

Une enzyme du métabolisme des acides aminés, l'alanine aminotransférase intervenant dans la phase d'assimilation, a été surexprimée dans les racines de colza transgéniques grâce à l'activité d'un promoteur spécifique des racines. L'augmentation de cette activité enzymatique confère aux plantes une plus grande capacité à utiliser l'azote [6]. Des résultats d'essais réalisés dans le Dakota du nord et au Minnesota ont montré en 2003 et en 2004 une productivité égale au témoin avec des apports azotés environ deux fois moindre pour des rendements de l'ordre de 3,4 tonnes à l'hectare. Par extrapolation, si ce génotype était étendu à la production mondiale, on réaliserait une éco-

nomie de 200 000 TEP (Tonne Equivalent Pétrole), soit 22 % des dépenses énergétiques de cette culture [4].

Après la phase d'assimilation qui permet le développement et la croissance des organes végétatifs, il y a une remobilisation des composés azotés, depuis les organes vieillissants puis sénescents ou « sources », vers les organes en cours de croissance et de développement ou « puits », dont les plus importants pour la production agricole sont les organes reproducteurs. De 60 à 95 % de l'azote présent dans le grain de blé provient de cette remobilisation contre 45 à 65 % chez le maïs [7]. Il a été montré par exemple chez le maïs que l'activité glutamine synthase avait un rôle majeur pendant la phase de remplissage, puisqu'il y a une corrélation statistique entre le rendement en grains et l'activité glutamine synthase [8]. La surexpression par transgénèse dans la feuille d'un gène de glutamine synthase (*Gln1-3*) a pour conséquence une augmentation du nombre de grains par épi en condition de nutrition azotée suboptimale, ce qui confirme le rôle déterminant de cette activité enzymatique [7]. Ceci ouvre des perspectives intéressantes de sélection pour des allèles plus efficaces de ces voies de remobilisation de l'azote.

Il a été montré que la surexpression d'un régulateur clé du métabolisme carboné (Dof1) provoque une augmentation de l'assimilation de l'azote et une croissance améliorée si son apport est limité [9]. Ceci confirme qu'un des facteurs limitants de ces étapes d'intégration à l'ensemble du métabolisme est le métabolisme du carbone qui fournit les squelettes carbonés des molécules. Ce dernier peut à son tour être limité par le déficit hydrique qui va restreindre la photosynthèse. En effet on constate que la nutrition azotée et le statut hydrique de la plante ne sont pas indépendants. En particulier un faible apport d'azote entraîne une moindre tolérance au stress hydrique et le stress hydrique ne permet pas une bonne utilisation de l'azote présent dans le sol. La même synergie existe chez les légumineuses entre la fixation par symbiose et la disponibilité en eau. Il est possible de sélectionner des génotypes qui ont une fixation améliorée en conditions de sécheresse [10]. Améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau et de l'azote constituent les principaux objectifs de sélection en particulier pour les cultures des régions sèches [11].

Les plantes face au déficit hydrique

On distingue classiquement trois façons pour les plantes de se protéger contre le déficit hydrique.

Elles peuvent tout simplement échapper au stress en raccourcissant leur cycle de dévelop-

pement de façon à achever la phase de reproduction avant que le stress physiologique du déficit hydrique ne vienne l'interrompre. Les variétés adaptées aux régions arides ont la capacité de réaliser précocement un cycle court, avec une vitesse rapide de croissance et d'accumulation des réserves.

Ou bien les plantes évitent le stress, c'est-à-dire résistent à un épisode de déficit hydrique en maintenant les tissus hydratés. Il s'agit de minimiser la perte d'eau par évaporation : les feuilles ferment leurs stomates, prennent un port plus dressé pour limiter la lumière incidente chez un maïs ou s'enroulent chez une dicotylédone. Des adaptations comme la densification des trichomes, la réduction de la taille des feuilles, ou leur chute programmée assez rapide après qu'elles aient atteint leur âge adulte sont de nature à limiter fortement ces pertes : un recyclage des métabolites économise l'eau qui aurait été nécessaire à leur néosynthèse. Les plantes vont également chercher à maximiser l'absorption de l'eau. Pour cela elles font appel à la plasticité du système racinaire dont l'expansion en profondeur est une caractéristique à forte composante génétique. L'essentiel des gains de productivité dans les zones semi-arides tient à l'amélioration génétique de ce trait [12].

Enfin certaines plantes tolèrent le stress une fois établi. Elles ont développé un certain nombre de mécanismes qui leur permettent de retarder, voire de supporter la déshydratation de leurs tissus et à l'extrême, survivre à l'état déshydraté en accumulant certains métabolites solubles comme le tréhalose, dans le cas de la plante de la résurrection (*Selaginella lepidophylla*) ou d'autres espèces des régions désertiques [13].

Du point de vue de la physiologie de la plante, le déficit hydrique du sol se traduit d'abord par une perception du potentiel hydrique du sol par des kinases membranaires qui envoient des signaux qui transitent par les vaisseaux conducteurs de la sève brute vers l'appareil aérien. Parmi ces signaux l'acide abscissique est une hormone qui provoque la fermeture des stomates ce qui a pour conséquence une réduction de la perte d'eau par la transpiration mais aussi un accès réduit du gaz carbonique aux cellules photosynthétiques. L'assimilation du carbone diminue, ce qui entraîne un ralentissement voire un arrêt de la croissance aérienne. Par contre la croissance racinaire est privilégiée pour permettre éventuellement une exploration de niveaux inférieurs du sol où le potentiel hydrique est plus fort. Les réactions de défenses au niveau cellulaire se traduisent par des changements importants du profil de transcription de plusieurs centaines de gènes. Des protéines spécialisées dans les états de dessiccation des tissus végétaux sont synthétisées. Les cellules

« luttent » contre la déshydratation en produisant en plus grande quantité des métabolites, acides aminés, amines, sucres, sucres-alcool, qui vont retenir une plus grande quantité d'eau. Ces protéines et ces métabolites vont aussi protéger les complexes enzymatiques et les membranes cellulaires du stress oxydatif consécutif à la déshydratation [14].

L'étude de ces comportements et de ces mécanismes de défense peut inspirer les stratégies d'amélioration génétique par la voie biotechnologique.

Biotechnologie végétale et déficit hydrique

Il est extrêmement difficile de pratiquer une sélection classique efficace pour un caractère aussi complexe que la tolérance au déficit hydrique. Non seulement la variation entre génotypes repose sur de nombreux gènes, mais la nature même du stress hydrique varie selon qu'il intervient progressivement ou soudainement, selon la phase de développement de la culture, selon les caractéristiques pédologiques et enfin en interaction éventuelle avec d'autres contraintes environnementales [15]. D'un point de vue pratique ce qui importe est la possibilité de maximiser le rendement de la culture dans ces conditions adverses variables. Deux stratégies de construction de variétés tolérantes sont suivies [16].

À partir de la variation spontanée, l'analyse des descendances de croisements entre des génotypes contrastés permet de localiser plus ou moins précisément sur les chromosomes les locus ou les gènes importants pour expliquer ces différences. Les marqueurs moléculaires de ces régions favorables peuvent alors être utilisés pour réaliser l'assemblage de ces gènes dans des cultivars : on parle de sélection assistée par marqueurs.

L'autre stratégie s'appuie sur la connaissance de la fonction de certaines protéines ou de l'analyse de l'effet de mutations induites que celles-ci concernent des gènes de fonction connue ou de fonction inconnue. Des gènes modifiés, en particulier dans leur régulation (surexpression, expression ciblée dans un tissu donné), sont produits par génie génétique et introduits par transgénèse, pour mesurer ensuite leur effet vis-à-vis de divers stress.

La sélection assistée par marqueurs

Chez le maïs, il a été démontré qu'il est possible d'introduire par sélection assistée par marqueurs plusieurs régions du génome impliquées dans le rendement en condition de stress hydrique. A titre d'exemple celui-ci a pu être amélioré par la réduction de l'asynchronie entre la maturité des organes mâles et femelles

qui est un des principaux effets du stress hydrique pendant la phase reproductrice [17].

Le système racinaire, déjà relativement plastique au cours de la réponse au stress hydrique, est d'une grande importance puisqu'il peut selon sa morphologie et sa longueur exploiter plus ou moins les ressources, en particulier hydriques, du sol. Il est cependant difficile de mettre en place des méthodes de sélection sur de grands effectifs pour un tel caractère qui se trouve donc peu exploité. Dans le cas du riz qui est une espèce qui consomme beaucoup d'eau (de l'ordre de 5 000 litres pour un kilogramme de grains) [18] la sécheresse affecte de plus en plus les riz pluviaux. Un système racinaire profond et vigoureux est un caractère recherché pour subvenir aux besoins de la plante pendant des périodes de sécheresse qui affectent d'abord les couches supérieures du sol. A partir d'études mettant en évidence l'existence de gènes déterminants l'architecture racinaire, des marqueurs moléculaires des régions chromosomiques correspondantes ont été identifiés et ont été utilisés pour les transférer à d'autres variétés. Ainsi à partir de la variété « Azucena » qui est un riz pluvial des Philippines caractérisé par un système racinaire profond, ce caractère a pu être transféré par croisement et sélection dans les descendances à l'aide de ces marqueurs moléculaires à des variétés du type Indica (IR64, Kalinga III) qui possédaient des systèmes racinaires moins développés, leur conférant une meilleure tolérance à des déficits hydriques [18, 19].

Si la sélection au sein de l'espèce cultivée s'avère délicate, une autre démarche qui consiste à rechercher des allèles intéressants dans le compartiment sauvage de l'espèce peut, comme dans le cas bien connu des résistances aux maladies, apporter des solutions. Par exemple on a pu montrer que l'orge sauvage (*Hordeum spontaneum*) est une source de gènes de tolérance à la sécheresse pour l'orge cultivée (*H. vulgare*) en région méditerranéenne et également de gènes qui peuvent améliorer le rendement en conditions non limitantes [20, 21].

Le génie génétique et la transgénèse

De nombreux travaux ont été réalisés depuis une quinzaine d'années majoritairement sur des plantes modèles [22].

Une première voie d'amélioration biotechnologique de la tolérance au déficit hydrique consiste à provoquer l'accumulation de métabolites protecteurs de la dessiccation par surproduction d'enzyme de leur métabolisme. Les gènes correspondants sont isolés de plantes ou de micro-organismes [23]. De bons exemples concernent la production de glycine bêtaïne chez *Arabidopsis* et le colza, de fructose de sorbitol et de tréhalose chez le tabac et la

potomme de terre. Les résultats sont variables et en particulier les concentrations de métabolites qui ne perturbent pas la physiologie de la plante sont parfois insuffisantes pour une protection efficace. Dans le cas du tréhalose la production continue de cette molécule assure aux plantes une protection contre le stress mais se traduit par des anomalies de développement en conditions normales. Un résultat très prometteur a été obtenu par l'expression de la tréhalose-6-phosphate synthase et de la tréhalose-6-phosphatase (T-6-P) sous le contrôle du promoteur d'un gène d'*Arabidopsis* induit par le stress ou par la production de T-6-P dans le chloroplaste, car alors, ces anomalies ne sont pas retrouvées [24].

Une autre possibilité consiste à prévenir l'entrée en sénescence en jouant sur le métabolisme hormonal. On sait depuis longtemps que la pulvérisation de cytokinine sur des feuilles âgées prévient leur entrée en sénescence. Un gène dont le promoteur est induit lors de l'entrée en sénescence (isolé d'un gène de protéine-kinase du haricot) et associé à une séquence qui code pour une iso-pentenyl-transférase a été introduit par transformation dans le tabac. Dans ces conditions le niveau de cytokinine dans les cellules de feuilles augmente dès que celles-ci commencent leur processus de sénescence pendant un stress hydrique prolongé, ce qui retarde cette dernière et permet à la plante de reprendre un métabolisme normal dans l'éventualité d'une suspension du stress [25].

Le maintien de la turgescence racinaire est primordial pour la croissance du système racinaire au cours des épisodes de déficit hydrique. Cette turgescence dépend du volume de la vacuole qui en réaction concentre des solutés dans cette perspective. Une façon d'augmenter cette tendance à l'accumulation de cations dans la vacuole est d'activer la pompe à proton qui dans un premier temps va acidifier la vacuole. En réaction l'antiport sodium/proton va être activé de sorte que les protons soient échangés avec les cations cytoplasmiques, ce qui aura pour conséquence d'augmenter l'appel d'eau vers la vacuole et de provoquer la turgescence cellulaire. Une conséquence indirecte sera une augmentation de la masse racinaire, une reprise plus rapide des plantes après un épisode de sécheresse. Cette stratégie a été appliquée au maïs avec succès [26].

Les facteurs de transcription régulent et d'une certaine manière coordonnent l'activité d'ensembles de gènes impliqués dans un processus biologique. Il est donc raisonnable de penser moduler plus efficacement la réponse au déficit hydrique en modifiant la régulation d'un facteur de transcription plutôt qu'en modifiant un gène particulier du réseau.

Des groupes de recherche de grande taille ont pu, sur la plante modèle *A. thaliana*, réaliser un test systématique de l'effet sur la tolérance au déficit hydrique de la surexpression d'un grand nombre de facteurs de transcription pris un à un. Ainsi des équipes de Monsanto et Mendel Biotechnology ont construit à partir d'environ 1 500 gènes codant des facteurs de transcription, des plantes dans lesquelles ces gènes sont surexprimés. Les lignées transformées d'*A. thaliana* ont été soumises à un test de tolérance au stress hydrique et des lignées tolérantes ont été sélectionnées. Une lignée particulière portait un gène construit à partir d'une sous-unité du facteur nucléaire Y (AtNF-YB1). Le gène correspondant de maïs (ZmNF-YB2) a été identifié et surexprimé chez le maïs où il permet en conditions agronomiques d'obtenir une production de grains supérieure de 15 à 50 % par rapport la variété non transformée, en conditions de stress telles que cette dernière voit son rendement diminuer de moitié [27].

La surexpression chez *A. thaliana* d'un autre facteur de transcription AtP2/ERF conduit à des changements morphologiques importants, en particulier un épaississement du parenchyme palissadique des feuilles et un grand développement du système racinaire. Ces changements ont, respectivement, deux conséquences physiologiques : une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau et une meilleure tolérance au stress hydrique. Quand ce facteur de transcription est surexprimé chez le riz l'effet est similaire et on note une augmentation de la biomasse d'environ 25 % en conditions normales et de 50 % en conditions de stress hydrique par rapport à la lignée de départ [28].

Une équipe chinoise en collaboration avec des laboratoires américains [29] a découvert que la surexpression d'un autre facteur de transcription, une protéine à homéodomaine « START » conduit à deux modifications morphologiques importantes : un système racinaire plus développé et une réduction du nombre de stomates par unité de surface de feuilles. Les plantes transgéniques de tabac obtenues ont une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau car elles transpirent moins tout en ayant une assimilation nette du gaz carbonique plus importante. On observe donc dans ce cas une rupture de la corrélation négative entre la photosynthèse et l'efficacité d'utilisation de l'eau [16] qui voudrait que toute amélioration de cette dernière entraîne une réduction du rendement en biomasse [30]. Un exemple analogue a été obtenu par surexpression chez le riz la protéine SNAC, un facteur de transcription qui est induit par le stress hydrique dans les cellules de garde des stomates. Les plantes qui en résultent perdent plus lentement leur eau par transpiration car elles sont plus sensibles à l'hormone ABA qui provoque la fermeture des

stomates. Cependant leur photosynthèse n'est pas affectée ce qui leur confère une capacité supérieure de production au champ en cas de stress sévère. De plus ces plantes se montrent résistantes à l'excès de sel [31].

Conclusion

Les quelques exemples précédents montrent qu'il est possible par la modification de l'expression de certains gènes d'améliorer l'utilisation de l'azote ou de l'eau par la plante ou de lui permettre de tolérer des déficits hydriques importants. Plus que l'action primaire de ces gènes, ce sont souvent leurs effets indirects (pléiotropie) qui expliquent leur performance par exemple en exacerbant le développement du système racinaire qui est le facteur clé pour l'exploitation des ressources du sol. L'architecture racinaire, l'efficacité d'utilisation de l'eau pour la production de biomasse issue de la photosynthèse, la protection des phases de reproduction contre les stress environnementaux sont les cibles à privilégier dans ces approches de génétique et de physiologie moléculaires [32, 33].

Il est clair que si l'on ne veut pas qu'une amélioration se trouve limitée à un nombre très restreint de variétés, l'idéal est d'identifier des gènes ayant un effet majeur de sorte qu'on puisse les introduire dans l'ensemble des cultivars concernés comme cela s'est produit pour les caractères de domestication ou les gènes de raccourcissement des pailles chez les céréales.

Il y a un très important effort de recherche dans le monde en particulier pour ce qui concerne la production alimentaire en condition de faible disponibilité en eau dans les pays tropicaux et subtropicaux [34]. Cependant il reste encore beaucoup à faire pour comprendre sur le plan physiologique des caractères aussi complexes et pour élaborer les outils et méthodes de sélection permettant de prédire avec certitude le comportement des cultures dans l'espace agricole à partir des performances obtenues en conditions expérimentales contrôlées.

RÉFÉRENCES

- Boyer JS. Plant productivity and environment. *Science* 1982 ; 218 : 443-8.
- Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture. Water for Food, Water for Life: a Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture*. London : Earthscan, and Colombo : International Water Management Institute, 2007.
- IPCC. Summary for Policymakers. In : Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL, eds. *Climate change 2007 : The physical science basis. contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA : Cambridge University Press, 2007.
- Strange A, Park J, Bennett R. Phipps. The use of life-cycle assessment to evaluate the environmental impacts of growing genetically modified, nitrogen use-efficient canola. *Plant Biotech J* 2008 ; 6 : 337-45.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996 ; 47 : 569-93.
- Good AG, Johnson SJ, De Pauw M, et al. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Can J Bot* 2007 ; 85 : 252-62.
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants : towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J Exp Bot* 2007 ; 58 : 2369-87.
- Gallais A, Hirel B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *J Exp Bot* 2004 ; 55 : 295-306.
- Yanagisawa S, Akiyama A, Kisada H, Uchimiya H, Miwa T. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants : Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 7833-8.
- Sinclair TR, Purcell LC, King CA, Sneller CH, Chen P, Vadez V. Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N₂ fixation. *Field Crops Res* 2007 ; 101 : 68-71.
- Cabrera-Bosquet L, Molero G, Bort J, Nogués S, Araus JL. The combined effect of constant water deficit and nitrogen supply on WUE, NUE and $\Delta^{13}C$ in durum wheat potted plants. *Ann Appl Biol* 2007 ; 151 : 277-89.
- Blum A, Ritchie JT. Effect of soil surface water content on sorghum root distribution in the soil. *Field Crops Res* 1984 ; 8 : 169-76.
- Zentella R, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, et al. A *Selaginella lepidophylla* Trehalose-6-Phosphate Synthase Complements Growth and Stress-Tolerance Defects in a Yeast tps1 Mutant. *Plant Physiol* 1999 ; 119 : 1473-82.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 2003 ; 30 : 239-64.
- Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 2005 ; 11 : 15-9.
- Parry MAJ, Flexas J, Medrano H. Prospects for crop production under drought : research priorities and future directions. *Ann Appl Biol* 2005 ; 147 : 211-26.
- Ribaut JM, Ragot M. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize : the backcross approach, perspectives, limitations and alternatives. *J Exp Bot* 2007 ; 58 : 351-60.
- Shen L, Courtois B, McNally KL, Robin S, Li Z. Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theor Appl Genet* 2001 ; 103 : 75-83.
- Steele KA, Price AH, Shashidhar HE, Witcombe JR. Marker-assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into Indian upland rice variety. *Theor Appl Genet* 2006 ; 112 : 208-21.
- Baum M, Grando S, Bakes G, Jahoor A, Sabbagh A, Ceccarelli S. QTLs for agronomic traits in the mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross 'Arta'X H. spontaneum 41-1. *Theor Appl Genet* 2003 ; 107 : 1215-25.
- Talamé V, Sanguinet MC, Chiapparino E, et al. Identification of *Hordeum spontaneum* QTL alleles improving field performance of barley grown under rainfed conditions. *Ann Appl Biol* 2004 ; 144 : 309-19.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Engineering drought tolerance in plants : discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Biotech* 2006 ; 17 : 113-22.
- Chen THH, Murata N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 2002 ; 5 : 250-7.
- Karim S, Aronsson H, Ericson H, et al. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Mol Biol* 2007 ; 64 : 371-86.
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, et al. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 19631-6.
- Park S, Li J, Pittman JK, et al. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-Ppase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 18830-5.
- Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, et al. Plant nuclear factor Y(NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 16450-5.
- Karaba A, Dixit S, Greco R, et al. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 15270-5.

29. Yu H, Chen X, Hong YY, *et al.* Activated expression of an Arabidopsis HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *Plant Cell* 2008 ; 20 : 1134-51.
30. Tardieu F. Virtual plants : modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends Plant Sci* 2003 ; 8 : 9-14.
31. Hu H, Dai M, Yao J, *et al.* Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 12987-92.
32. Passioura J. The drought environment : physical, biological and agricultural perspectives. *J Exp Bot* 2007 ; 58 : 113-7.
33. Tuberosa R, Salvi S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci* 2006 ; 11 : 405-12.
34. Delmer DP. Agriculture in the developing world :connecting innovations in plant research to downstream applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 15739-46.