

Améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote chez les plantes cultivées

Bertrand Hirel^a et André Gallais^b

^aDirecteur de Recherche INRA, Versailles

^bProfesseur émérite AgroParisTech, Membre de l'Académie d'agriculture de France

Manuscrit révisé le 10 juillet 2012 - Publié le 28 octobre 2013

Résumé

L'azote est l'un des principaux facteurs limitant la croissance et le développement des plantes et donc le rendement. Par conséquent, quel que soit le type de fertilisation azotée, minérale ou organique, une connaissance accrue des mécanismes contrôlant l'absorption et l'utilisation de l'azote par les plantes cultivées est essentielle pour améliorer son efficacité et limiter la perte de nitrates dans l'environnement. Cette amélioration devra maintenir à la fois un rendement assez élevé nécessaire pour l'alimentation d'une population en constante augmentation et permettre une marge bénéficiaire suffisante aux agriculteurs.

Des études visant à améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote par les plantes cultivées sont actuellement conduites en utilisant la sélection classique et la génétique moléculaire tout en tenant compte des possibilités d'amélioration des techniques culturales. L'ensemble de ces études basées à l'origine sur des approches agronomiques, physiologiques et génétiques sont complétées à l'heure actuelle par l'emploi de techniques à haut débit, permettant d'obtenir des profils d'expression de gènes, de protéines et d'accumulation de métabolites au cours du développement de la plante et ceci dans ses différents organes et en fonction du niveau de fertilisation azotée.

À l'aide d'approches de génétique quantitative et de biologie des systèmes, il est maintenant possible d'obtenir une vue d'ensemble des étapes impliquées dans l'absorption, l'assimilation et le recyclage de l'azote et d'identifier les éléments importants impliqués dans leur régulation. Les perspectives d'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote chez les plantes de grande culture sont présentées aussi bien par la voie de la sélection classique et la sélection assistée par marqueurs que par l'utilisation de la transgénèse. Des travaux de recherche récents suggèrent que produire des céréales fixatrices d'azote atmosphérique n'est plus une chimère.

Mots clés : azote, fumure azotée, biologie des systèmes, fixation d'azote atmosphérique, génétique quantitative, transgénèse.

1. Fertilisation azotée et enjeux socio-économiques et environnementaux

A l'heure actuelle, pour maintenir ou enrichir la teneur en nutriments du sol et ainsi augmenter les rendements des cultures, l'application d'engrais minéraux tels que l'azote est la pratique agricole la plus couramment utilisée. L'azote des engrais commerciaux apporté au sol est particulièrement soluble, ce qui facilite son absorption et son assimilation par les plantes. Les engrais minéraux sont aujourd'hui la principale source d'éléments nutritifs fournis aux sols, même si la contribution des engrais organiques issus des déjections animales reste non négligeable (surtout quand il y a une densité de bétail importante à proximité). Après la Seconde Guerre mondiale, les engrais azotés ont été largement utilisés pour augmenter le

rendement des cultures. La synthèse d'ammoniac par le procédé Haber-Bosch¹, nécessaire à la production d'engrais azotés minéraux, a été l'une des inventions les plus importantes du XX^e siècle, permettant ainsi d'assurer la production de nourriture pour près de la moitié de la population mondiale (Galloway *et al.* 2008). De ce fait, la consommation mondiale d'engrais synthétiques azotés a augmenté de manière spectaculaire passant de 11,6 millions de tonnes en 1961 à 104 millions de tonnes en 2006 (Mulvaney *et al.* 2009). En 40 ans, la quantité d'azote minéral utilisé en agriculture a augmenté de 7,4 fois, tandis que l'augmentation du rendement global a seulement augmenté de 2,4 fois (Tilman *et al.* 2002). L'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA), définie comme le rendement obtenu par unité d'azote disponible dans le sol (fourni par le sol et par les engrais apportés) a donc fortement diminué.

L'EUA est la résultante de l'efficacité d'absorption (quantité d'azote absorbé par rapport à la quantité d'azote disponible) et l'efficacité d'utilisation (quantité d'azote utilisé pour produire du rendement par rapport à la quantité d'azote absorbé). Pour un grand nombre de plantes cultivées, il existe une variabilité génétique à la fois pour l'efficacité d'absorption et pour l'efficacité d'utilisation de l'azote (Hirel *et al.* 2007). En outre, l'existence d'interactions entre le génotype et le niveau de fertilisation azotée, suggère que les plantes les plus efficaces pour absorber l'azote du sol quand il est présent en quantité importante ne sont pas nécessairement celles qui le sont quand l'apport d'azote est plus faible (Gallais et Coque, 2005). Dans la plupart des systèmes de production agricole intensifs, plus de 50% et jusqu'à 75% de l'azote apporté n'est pas utilisé par la plante car il est perdu par lessivage au niveau du sol (Raun et Johnson, 1999).

Les nitrates sont les engrais azotés minéraux les plus utilisés en agriculture. Ils sont très solubles et peuvent être rapidement entraînés lors de l'écoulement des eaux de surface vers les cours d'eau et les nappes phréatiques. Une concentration élevée de nitrates dans l'eau de consommation peut constituer un risque pour la santé humaine (Umar et Iqbal, 2010). En outre, l'industrie de l'eau doit faire face à des coûts supplémentaires pour éliminer les nitrates des sources (Cameron et Schipper, 2010). Cette fuite de nitrates peut aussi avoir des conséquences négatives sur l'environnement avec l'eutrophisation de l'eau douce et des écosystèmes marins (London, 2005). Ce phénomène se manifeste par une prolifération d'algues vertes, qui réduit la pénétration de lumière, appauvrit en oxygène les eaux de surface, et fait disparaître les invertébrés vivant dans les fonds marins. Ces algues peuvent aussi produire des toxines nocives pour les poissons, pour le bétail et pour les humains.

Les sols contenant un surplus d'azote minéral constituent également une source de l'émission de N₂O (oxyde nitreux), qui peut réagir avec l'ozone stratosphérique, augmentant ainsi l'effet de serre. L'excès d'azote dans le sol peut aussi provoquer des émissions toxiques d'ammoniac dans l'atmosphère qui peuvent contribuer à l'acidification des sols par les pluies acides (Ramos, 1996).

La fabrication industrielle des engrais azotés minéraux est très coûteuse en énergie (Galloway, 2008). Pour certaines cultures, le coût des engrais azotés peut représenter à l'heure actuelle jusqu'à 50% des charges opérationnelles énergétiques d'une culture (Reganold *et al.* 1990). Globalement, le coût de la fabrication des engrais azotés minéraux et de leur impact sur l'environnement est estimé à 100 milliards de dollars par an (Beatty et Good, 2011). En

¹ Synthèse chimique réalisée à partir de l'azote atmosphérique nécessitant beaucoup d'énergie.

comparaison, la fixation d'azote atmosphérique symbiotique réalisée par les légumineuses est « gratuite » pour une production de biomasse ou de grains presque équivalente à celle obtenue avec des espèces non fixatrices, demandant une fertilisation azotée (Andrews *et al.* 2009). Par conséquent, il serait avantageux pour l'agriculteur de cultiver plus de légumineuses. Cependant, il faut tenir compte du fait que l'on ne contrôle pas la minéralisation des quantités importantes d'azote organique d'un sol après la récolte d'une légumineuse, ce qui peut entraîner des fuites de nitrates supérieures à celles se produisant lors d'une culture de céréale avec l'apport d'engrais azotés.

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est l'une des sources les plus importantes d'azote dans les systèmes agricoles, estimée à environ 122 millions de tonnes par an, soit une quantité du même ordre que la production industrielle d'engrais azotés. Les associations symbiotiques entre légumineuses et des bactéries du genre *Rhizobium* sont parmi les plus efficaces (Liu *et al.* 2001). Mais, il existe aussi des associations non symbiotiques, comme celles existant entre les bactéries libres du sol fixatrices d'azote présentes dans la rhizosphère du riz, de la canne à sucre canne et des céréales (Andrews *et al.* 2009).

Pour nourrir la population mondiale en 2050, qui atteindra probablement 9 milliards d'individus, il sera nécessaire d'augmenter la production agricole de 70 % (Food and Agriculture Organization, FAO; <http://www.fao.org/docrep/005/y4137e/y4137e02b.htm>). Cette augmentation de la production agricole même si elle doit concerner principalement les pays en développement, se traduira nécessairement par une augmentation de la consommation et donc de la production d'engrais azotés. L'impact négatif de l'utilisation des engrais azotés sur l'environnement pourra être minimisé si des pratiques agricoles durables lui sont associées, tels qu'une gestion optimale de la fertilisation, une rotation des cultures, une mise en place d'un couvert végétal ou un enfouissement des résidus de récolte dans le sol.

Cet impact peut être aussi fortement limité par l'utilisation de variétés absorbant et valorisant bien l'azote apporté ou fourni par la minéralisation de l'azote organique. Ces variétés peuvent être mises au point par sélection conventionnelle ou par transgénèse. Sélectionner des variétés capables d'établir des associations symbiotiques plus performantes soit avec des bactéries soit avec des champignons, peut constituer une autre alternative pour augmenter la productivité des cultures tout en utilisant la même quantité de fertilisants azotés synthétiques (Renzel, 2002).

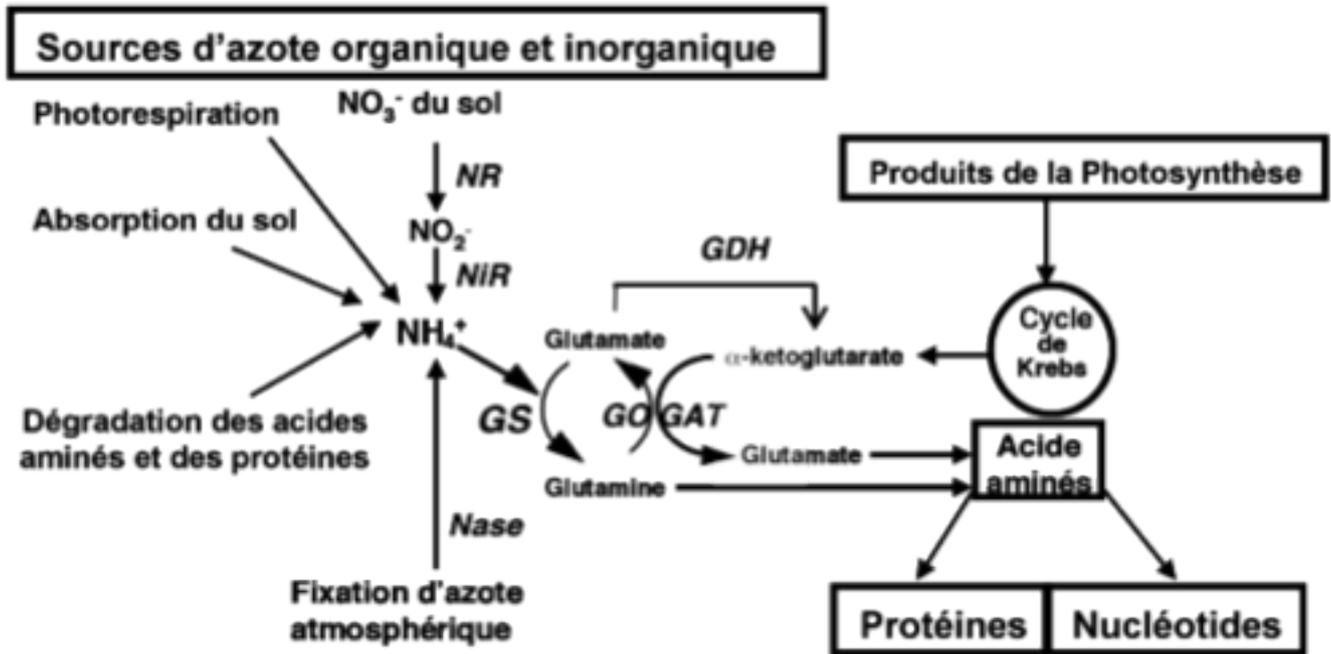
2. Exploiter la variabilité génétique pour identifier les fonctions biologiques impliquées et sélectionner des plantes valorisant mieux l'azote

Chez la plupart des plantes non fixatrices d'azote atmosphérique, l'azote est absorbé principalement sous forme de nitrates et de façon marginale sous forme d'ammonium ou d'autres formes d'azote organique plus complexes.

Les caractéristiques du système racinaire jouent probablement un rôle majeur dans cette absorption, comme pour l'absorption de l'eau et des autres éléments nutritifs (voir l'article « Nutrition minérale des plantes: aspects moléculaires »). Par conséquent, bien comprendre la relation entre la croissance, la productivité de la plante et le fonctionnement des racines d'une manière dynamique au niveau du sol est capital. La principale difficulté est l'évaluation de l'influence de l'architecture des racines et des systèmes de transport d'azote sur l'EUA dans des

conditions agronomiques. Cependant, il n'y a pour le moment pas eu de démonstration formelle du rôle limitant des systèmes de transport d'azote dans ces organes sur l'EUA (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010 ; Pathak *et al.* 2011).

Encadré 1. Principales étapes de l'assimilation de l'azote chez les plantes supérieures.



NO_3^- = nitrate; NO_2^- = nitrite; NH_4^+ = ammonium, N_2 = azote gazeux atmosphérique. Les principales enzymes impliquées dans la réduction du nitrate et dans l'assimilation de l'ammonium sont en caractères italique : *NR* = nitrate réductase ; *NiR* = nitrite réductase ; *Nase* = nitrogénase ; *GDH* = Glutamate déshydrogénase ; *GS* = glutamine synthétase ; *GOGAT* = glutamate synthase. L'ammonium est incorporé dans les molécules organiques sous forme de Glutamine et de Glutamate à l'aide des deux réactions catalysées par les enzymes *GS* et *GOGAT*. Le carbone provenant de la photosynthèse est fourni à partir du cycle des acides tricarboxyliques (Cycle de Krebs) sous forme d' α -cétoglutarate, molécule nécessaire pour la réaction catalysée par l'enzyme *GOGAT*. Dans certaines conditions physiologiques l' α -cétoglutarate peut provenir de la réaction catalysée par la *GDH*. La Glutamine et le Glutamate servent de donneurs d'azote pour la synthèse des autres acides aminés (utilisés pour la synthèse des protéines), des nucléotides et de toutes les molécules contenant de l'azote.

Les nitrates du sol sont absorbés à l'aide de transporteurs membranaires. Ils sont ensuite réduits en nitrites au cours d'une réaction catalysée par l'enzyme nitrate réductase (*NR*). L'enzyme nitrite réductase (*NiR*) réduit ensuite les nitrites en ammonium. L'ammonium contribue à la synthèse des premiers acides aminés (Glutamine et Glutamate) lorsqu'il est incorporé dans des molécules organiques par l'action combinée de deux enzymes, la glutamine synthétase (*GS*) et la glutamate synthase (*GOGAT*) (Encadré 1). L'azote contenu dans le Glutamate et la Glutamine est alors transféré à des acides organiques pour permettre la synthèse d'autres acides aminés par des réactions catalysées par différentes enzymes de type aminotransférases (Hirel et Lea, 2001). La régulation de la synthèse et de l'activité des enzymes impliquées dans l'assimilation du nitrate et de l'ammonium a fait l'objet de nombreux travaux depuis les années 70. La plupart des mécanismes contrôlant l'expression des gènes codants les transporteurs de nitrate et des enzymes impliquée dans son assimilation ont également fait l'objet d'études approfondies (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010).

Cependant, l'EUA est un caractère agronomique résultant de plusieurs étapes qui individuellement peuvent être limitantes ; c'est un caractère complexe contrôlé par un grand nombre de gènes. Pour cette raison, la détection de locus² à effets quantitatifs (QTL³) a connu un développement important au cours des ces quinze dernières années. En tirant parti de la variabilité génétique pour des caractères agronomiques et physiologiques complexes, la détection de QTL a constitué un moyen puissant pour identifier des gènes impliqués dans leur contrôle (Xu, 1997). Elle permet en effet de localiser des QTL pour un caractère agronomique sur une carte génétique. Il devient alors possible de vérifier leur signification génétique en recherchant des colocalisations entre ces QTL pour ces caractères agronomiques (rendement, biomasse), des QTL pour des caractères physiologiques (activités enzymatiques, teneurs en métabolites, efficacité d'absorption et d'utilisation d'un composé comme l'azote) et des gènes potentiellement impliqués dans le contrôle du caractère, appelés gènes candidats. La validation fonctionnelle des gènes candidats peut ensuite être entreprise en utilisant la transgénèse, la mutagenèse ou en étudiant la relation entre le polymorphisme des allèles de ces gènes et le caractère agronomique d'intérêt (Yu et Buckler, 2006). Le clonage des gènes candidats peut être également entrepris en resserrant la position du QTL sur la carte génétique pour finalement arriver à un seul gène coïncidant avec le QTL (Salvi et Tuberosa, 2007) (Encadré 2).

En général il a été constaté que la plupart des régions chromosomiques ou QTL contrôlant le rendement en grain et certains caractères impliqués dans le contrôle de l'EUA étaient pratiquement les mêmes quel que soit le niveau de fertilisation en azote (Bertin et Gallais, 2001). Fait intéressant, des colocalisations ont été détectées entre des QTL pour le rendement, des QTL d'activité glutamine synthétase (GS ; voir encadré 1) et deux gènes codant pour cette enzyme : Gln1-3 et Gln1-4. Ce résultat a permis d'émettre l'hypothèse que ces deux gènes candidats pourraient contrôler au moins en partie l'élaboration du rendement en grains (Hirel et Gallais, 2004). Cette hypothèse a été par la suite validée par l'étude de mutants. En effet, chez des maïs mutants déficients pour l'expression des deux gènes GS, on a pu observer une réduction du rendement au niveau de la taille des grains pour la mutation Gln1-4 et du nombre de grains pour la mutation Gln1-3 (Encadré 2).

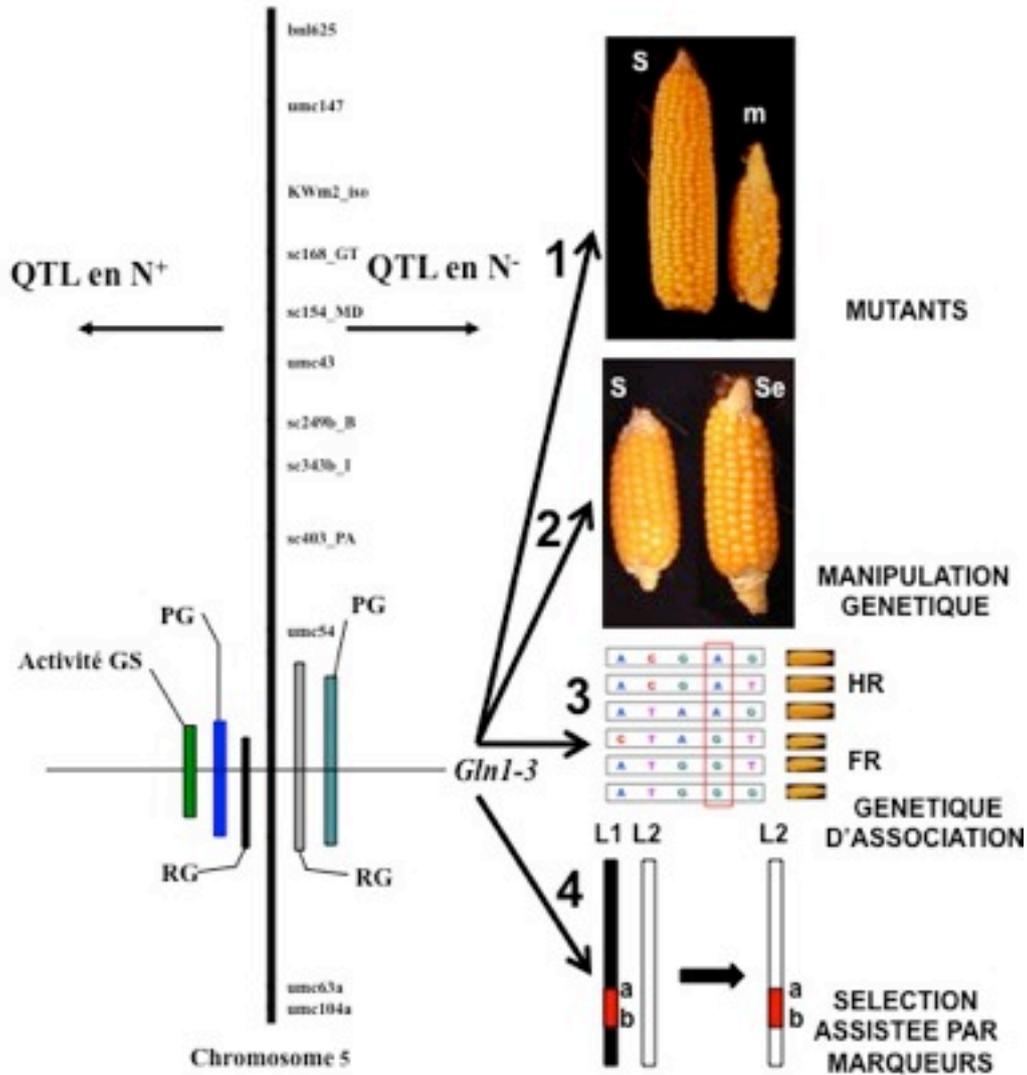
Une approche tout à fait similaire conduite chez le riz a permis d'identifier un QTL pour le poids des épillets colocalisant avec un gène codant la GS cytosolique. Des mutants de riz déficients pour la GS présentent une forte diminution du rendement en grains, confirmant ainsi que l'enzyme GS joue un rôle important dans l'élaboration du rendement chez certaines céréales (Obara *et al.* 2001). Cependant, chez une autre céréale, le blé, bien que des colocalisations entre un gène codant la GS et un QTL d'activité enzymatique aient été mises en évidence, elles ne colocalisent pas avec les QTL de rendement en grains (Fontaine *et al.* 2009). En revanche, chez cette même espèce, la colocalisation d'un gène codant la glutamate synthase et d'un QTL de rendement en grains, suggère que cette autre enzyme, elle aussi impliquée dans le métabolisme de l'azote, pourrait contribuer de manière importante à l'élaboration du rendement (Quraishi *et al.* 2011).

Par ailleurs, chez le pin maritime, espèce ligneuse très éloignée des céréales d'un point de vue évolutif, un QTL pour la quantité de protéine GS est situé au niveau d'un gène codant la GS

² Un locus est l'emplacement d'un gène sur le chromosome.

³ Pour Quantitative Trait Locus (locus impliqué dans la variation d'un caractère quantitatif).

Encadré 2. Exemple d'identification et de validation d'un gène candidat impliqué dans le contrôle de l'efficacité d'utilisation de l'azote et le rendement du maïs.



À gauche sur le chromosome 5 du maïs est présentée une co-localisation observée de plusieurs QTL pour différents caractères du rendement (PG = poids des grains, RD = rendement en grain) et pour l'activité de l'enzyme glutamine synthétase (GS) au niveau du locus *Gln1-3* (GS codant une enzyme cytosolique impliquée dans l'assimilation de l'azote minéral). N⁺ signifie que les QTLs ont été détectés avec un fort niveau de fertilisation azotée et N⁻ quand la fertilisation azotée est réduite. Ce résultat montre que le gène *Gln1-3* est un bon gène candidat pour expliquer qu'une variation de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) peut contrôler le rendement.

La validation fonctionnelle du gène candidat *Gln1.3* peut ensuite être réalisée en utilisant :

- (1) un mutant (m) présentant une réduction du rendement en grain par rapport à la plante sauvage (S) ;
- (2) une transgénèse permettant la surexpression (Se) du gène *Gln1.3* chez des maïs transgéniques permettant d'augmenter le rendement en grains par rapport à la plante non transformée (S) (Martin et al. 2006) ;
- (3) en utilisant la génétique d'association liant polymorphisme nucléotidique du gène *Gln1.3* à l'augmentation du rendement (HR = haut rendement ; FR = faible rendement) pour identifier les allèles de *Gln1.3* plus performants dans une population couvrant la diversité génétique du maïs.

La sélection assistée par marqueurs (MAS) peut alors être entreprise par les sélectionneurs avec des plantes choisies non pas sur la base du caractère sélectionné (rendement), mais sur la présence de marqueurs liés aux allèles favorables des QTL détectés (ici, les marqueurs a et b). À l'aide de ces marqueurs, les allèles favorables peuvent être réunis dans un même génotype.

et d'un QTL pour la biomasse (Plomion *et al.* 2004). La surexpression⁴ de ce gène chez le peuplier permet d'augmenter la croissance des arbres transgéniques et la production de bois d'environ 40%. Comme nous le verrons dans le paragraphe qui suit il apparaît clairement que la réaction catalysée par la GS est une étape importante intervenant dans le contrôle de la productivité chez plusieurs espèces de plantes cultivées.

Ces quelques exemples montrent que la génétique des caractères quantitatifs, grâce aux marqueurs moléculaires du génome, est un outil très puissant pour identifier des gènes candidats impliqués à la fois dans les contrôles de l'EUA et de la productivité végétale. Contrairement à celles décrites précédemment, très peu d'études ont été réalisées avec des plantes utilisant une fertilisation azotée de type organique plutôt que de type minéral. Il s'agirait de déterminer si le contrôle génétique de l'EUA dans des conditions de fertilisation organique ou conventionnel est semblable, ou bien s'il y a des gènes spécifiques ou des combinaisons de gènes qui sont plus adaptées à l'un des deux modes de fertilisations en tenant compte du fait que certains éléments de nature organique peuvent être prélevés directement dans le sol par la plante (Lammerts *et al.* 2010).

3. Améliorer l'assimilation de l'azote à l'aide de la transgénèse

Modifier par transgénèse l'expression d'un ou plusieurs gènes codant les enzymes ou les protéines impliquées dans l'absorption, l'assimilation et le recyclage de l'azote (voir l'article : "Nutrition minérale des plantes : aspects moléculaires") chez une plante constitue l'un des moyens d'augmenter l'EUA. A la suite de plusieurs études, il a été montré que la réduction des nitrates n'est pas une étape déterminante pour l'élaboration du rendement en grain ou pour la production de biomasse. En revanche, ce n'est pas le cas pour la voie d'assimilation de l'ammonium (Andrews *et al.* 2004).

Par exemple, chez des tabacs modifiés génétiquement chez lesquels on a surexprimé un gène codant la glutamine synthétase, l'enzyme principalement responsable de l'incorporation d'azote minéral (sous forme d'ion d'ammonium) dans une molécule organique, on observe une augmentation de la photosynthèse et de la croissance des plantes quand la fertilisation azotée est réduite (Fuentes *et al.* 2001). De même, chez le peuplier, la surexpression de la GS permet une augmentation de 41%, augmentation du taux de croissance et au final de production de biomasse (Man *et al.* 2005). Chez le maïs, la surexpression d'un gène GS, conduit à une augmentation du rendement en grain (nombre de grains principalement) d'environ 30% (Encadré 2). Toutefois, le contenu en azote du grain et la production de biomasse des plantes manipulées génétiquement ne sont pas modifiés (Martin *et al.* 2006). Plus récemment, le même type de transgénèse réalisé chez le riz a permis de montrer que seul l'indice de récolte⁵ est amélioré chez les plantes transgéniques quel que soit le niveau de nutrition azoté (Brauer *et al.* 2011).

Curieusement, chez d'autres espèces, la surexpression de la GS a un impact plutôt négatif sur la croissance et le rendement de la plante. Par exemple, chez une légumineuse comme le Lotier (*Lotus corniculatus* L.) on observe une accélération de la sénescence des feuilles, ce qui entraîne un retard dans le développement de la plante modifiée génétiquement (Vincent *et al.* 2007).

⁴ La surexpression d'un gène conduit à faire produire plus de la protéine qu'il code afin d'augmenter son activité biologique dans la plante.

⁵ Proportion de la matière sèche du grain dans la matière sèche totale de la partie aérienne de la plante.

L'ensemble de ces travaux suggère que suivant l'espèce étudiée l'impact d'une même transgénèse peut être très différent, probablement parce que les mécanismes biochimiques impliqués dans l'assimilation de l'azote sont spécifiques à chaque espèce. De plus, chaque espèce possède un mode de croissance et développement ainsi qu'une réponse à une carence azotée très différents. Il sera donc nécessaire pour de futures applications en amélioration des plantes, de réaliser ce type de transgénèse au cas par cas en tenant compte à la fois des spécificités physiologiques et du mode de développement de chaque espèce.

Chez le colza, la surexpression d'un gène codant une enzyme, l'alanine aminotransférase ou AlaAT, impliquée dans la biosynthèse de l'alanine à partir du Glutamate (voir encadré 1), acide aminé majeur du métabolisme de l'azote chez les plantes, a permis d'augmenter de manière spectaculaire la production de biomasse et le rendement en grain (Good et al. 2007). Cette amélioration de la productivité des colzas n'a été observée que dans des conditions de fertilisation azotée réduite. La surexpression du même gène chez le riz a également permis d'augmenter la production de biomasse, avec un développement plus important des racines, mais aussi la teneur en azote des tiges.

Il existe dans la littérature quelques autres exemples de transgénèse visant à modifier l'EUA qui ont conduit, par la surexpression de certains gènes, à une amélioration des performances des plantes. Lorsque la glutamate déshydrogénase (GDH ; voir encadré 1) une autre enzyme impliquée dans la régulation de la production d'un autre acide aminé, le glutamate, est surexprimée chez le tabac, la production de biomasse des plantes transgéniques est augmentée d'environ 10 à 15%. Leurs feuilles contiennent des quantités plus importantes d'acides aminés, ce qui suggère qu'une bonne partie du métabolisme azoté de la plante a été stimulé, cependant il n'a pas été observé de modifications majeures au niveau de la croissance des plantes manipulées génétiquement (Ameziane *et al.* 2000).

Chez le riz, la surexpression d'un gène de fonction inconnue, isolé à la suite d'une étude visant à identifier des gènes dont l'expression est modifiée en fonction du niveau de nutrition azotée de la plante, a permis d'augmenter le rendement en grain de 13 à 23% respectivement en conditions de nutrition azotée limitantes et non limitantes (Bi *et al.* 2009). Cette expérience démontre que d'autres gènes peuvent être utilisés en transgénèse pour améliorer l'EUA, même si leur fonction n'est pas connue. L'étude de la physiologie des plantes chez lesquelles ces gènes ont été surexprimés, peut par la suite nous renseigner sur leur rôle au sein du métabolisme azoté pour identifier de nouvelles cibles d'amélioration de l'EUA.

Il y a nettement moins d'études dans lesquelles l'importance des gènes de régulation, qui contrôlent l'expression de gènes structuraux codant les enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote, a été clairement démontrée. Par exemple quand un gène de maïs codant un facteur de transcription appelé Dof1 est surexprimé chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* L.), on observe une augmentation de la teneur en acides aminés et de l'absorption de l'azote, en particulier lorsque les plantes sont carencées en azote. De plus, ces plantes transgéniques produisent plus de biomasse et ne présentent pas de symptômes de carence en azote par rapport aux plantes témoins non transformées. Lorsque le Dof 1 gène est surexprimé chez la pomme de terre, les plantes transgéniques accumulent plus d'acides aminés comme la glutamine et le glutamate (Yanagisawa *et al.* 2004). Ces deux séries d'expériences suggèrent qu'un gène régulateur provenant d'une espèce donnée pourrait être utilisé pour améliorer

l'absorption et l'utilisation de l'azote chez d'autres espèces très éloignées au niveau phylogénique. Par conséquent la surexpression de gènes régulateurs plutôt que gènes de structure, tels que ceux codant la GS ou AlaAT, pour lesquels on peut observer des effets néfastes sur le développement de la plante, constitue une alternative intéressante pour améliorer l'EUA et la croissance des plantes d'une manière plus stable et plus fiable chez différentes espèces.

Bien que nous n'ayons pas d'informations claires du secteur privé au sujet des essais réalisés au champ et la commercialisation de plantes transgéniques modifiées pour l'EUA, il est fort probable que dans les dix prochaines années du maïs, du blé ou du riz transgénique surexprimant des enzymes comme l'AlaAT et la GS seront commercialisés. Cette commercialisation n'est possible qu'après une longue série de tests étalés sur plusieurs années et localisés dans différents endroits pour vérifier si leur rendement est augmenté de manière stable dans des fonds génétiques différents. Ce type de développement n'est pour le moment pas envisagé en Europe, compte tenu des réticences de l'opinion publique vis-à-vis de l'utilisation de plantes génétiquement modifiées et de leurs dérivés. Une mise au point très complète sur l'état des lieux concernant l'amélioration de l'EUA par transgénèse, les brevets déposés et les futurs développements commerciaux a récemment été publiée par Pathak *et al.* (2011).

4. Ce que peuvent apporter la biologie intégrative et la modélisation pour améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote

Des travaux complémentaires sont nécessaires pour déterminer si, quand la disponibilité en azote est réduite ou élevée, d'autres « acteurs » comme des enzymes, des transporteurs ou des protéines régulatrices exprimés dans les racines ou les parties aériennes de la plante pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'EUA, et ceci quel que soit le type de conditions de fertilisation azotée (organique ou minérale). Il sera donc nécessaire d'identifier de nouveaux gènes dont l'expression est modifiée en fonction de la disponibilité en azote grâce à des analyses détaillées de données de transcriptome⁶. L'identification de ces nouveaux gènes pourra se faire au cours du développement de la plante pendant les phases d'absorption, d'assimilation et de recyclage de l'azote aussi bien dans les parties végétatives (feuilles, racine et tiges) que dans les organes reproducteurs (grains en développement et organes supportant les grains, assurant le transfert de carbone et d'azote). Il s'agira également de déterminer si ces gènes identifiés sont différents lorsque l'on fournit des quantités plus ou moins importantes d'azote. Ces données peuvent être utilisées pour développer des approches de biologie des systèmes (Hirel *et al.* 2011).

La biologie des systèmes consiste à tirer profit de jeux de données regroupées sous le terme "omiques", comprenant celles obtenues par des études de transcriptome (expression des gènes), de protéome (expression des protéines) et de métabolome (quantification de l'ensemble des métabolites produits par la plante). Le phénotypage à haut débit, ou "phénomique", consistant à mesurer un grand nombre de paramètres de croissance et de développement de la plante, peut

⁶ Le transcriptome représente l'ensemble des ARN (acides ribonucléiques) produits par la plante résultant de la lecture des gènes à un instant donné.

apporter des données supplémentaires. Il s'agit ensuite d'analyser toutes ces données de manière intégrée grâce à l'utilisation d'outils mathématiques et informatiques appliqués à la biologie pour comprendre ce qui se passe entre les différentes étapes allant de la transcription d'un gène à la production d'un métabolite (Guttièrez *et al.* 2007).

Les approches métabolomiques et phénomiques sont de plus en plus utilisées pour cribler un nombre très important de génotypes pouvant aller jusqu'à plusieurs milliers (mutants, plantes transgéniques, populations de lignées recombinantes) et ainsi augmenter les chances de relier le métabolisme de la plante et donc son fonctionnement, à l'expression d'un ou de plusieurs groupes de gènes (Lisec *et al.* 2008). Ceci a incité un certain nombre de groupes, à concentrer leurs efforts de recherche sur le développement d'outils d'intégration de données métaboliques en complément des études d'expression de gènes. Parmi ces outils, la construction de modèles métaboliques à l'échelle du génome de la plante, a été entreprise récemment (Gomez de Oliveira Dal'Molin *et al.* 2010). Ces modèles métaboliques devraient aider à identifier quelles sont les fonctions métaboliques, voire les réactions enzymatiques et leur régulation, les plus importantes au niveau du contrôle d'un processus biologique complexe comme l'EUA. Une fois ces fonctions identifiées, les efforts de recherche pourront être concentrés sur certaines de ces fonctions, en tenant compte des compartiments cellulaires, des tissus et de la présence de différents organes chez une plante.

En utilisant les connaissances acquises à partir de ces diverses approches de biologie des systèmes, il devrait alors être possible de cartographier les gènes impliqués dans l'expression de ces fonctions biologiques, en mettant à profit la disponibilité de données de séquences de génomes entiers, de cartes physiques et génétiques à haute densité et de données de QTL publiées par l'ensemble de la communauté scientifique dans le domaine végétal (Quirashi *et al.* 2011). Comme décrit précédemment, la validation fonctionnelle des gènes candidats identifiés pourra être entreprise en utilisant la mutagenèse et la transgenèse. Grâce aux marqueurs moléculaires, les QTL et les gènes identifiés pourront être réunis relativement rapidement dans un même génotype en utilisant la sélection assistée par marqueurs (SAM)⁷.

5. Pourra-t-on produire des céréales fixatrices d'azote atmosphérique ?

Un moyen possible de réduire le coût des engrais azotés et leur impact sur l'environnement serait de produire par le biais du génie génétique des plantes cultivées (céréales en particulier) capables de fixer l'azote atmosphérique comme les légumineuses (Beatty et Good, 2011). Les évolutions récentes dans ce domaine de recherche indiquent qu'il y a effectivement plusieurs options possibles pour y arriver. A la fois l'identification des gènes des bactéries qui codent le complexe enzymatique permettant la fixation d'azote atmosphérique (la nitrogénase, voir encadré 1) et la bonne connaissance de la biologie du système ouvrent des perspectives intéressantes pour produire du riz, du blé ou du maïs fixateur d'azote atmosphérique. Plusieurs approches semblent actuellement prometteuses.

⁷ La sélection assistée par marqueurs est une méthode de sélection qui vise, par l'utilisation des marqueurs liés aux QTL, à réunir les allèles favorables des QTL dans un même génotype.

L'une d'elle serait de faire produire des nodosités racinaires par les céréales semblables à celles que l'on trouve chez les légumineuses et les autres plantes à actinorhizes⁸. Ces nodosités se développent au cours de l'établissement d'une symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium* ou des actinomycètes du genre *Frankia*, permettant à la nodosité de fixer l'azote de l'air. Les deux types de microorganismes colonisent la cellule racinaire végétale et se retrouvent logés dans les cellules de la nodosité chez lesquelles la teneur en oxygène est réduite, permettant le fonctionnement du complexe nitrogénase dont l'activité est inhibée par ce gaz. Il sera donc nécessaire de modifier génétiquement les *Rhizobium* et les *Frankia* pour qu'ils reconnaissent et infectent les cellules racinaires des céréales et ainsi leur faire produire des nodosités fixatrices d'azote atmosphérique. Au cours de l'établissement de la symbiose, la plante sécrète des flavonoïdes qui déclenchent la production de polysaccharides appelées facteurs de nodulation (facteurs Nod) induisant la formation des nodosités (voir l'article « Nutrition minérale des plantes : aspects moléculaires »).

Récemment, d'autres facteurs appelés facteurs Myc, intervenant dans les relations entre 70 à 90% de plantes terrestres (y compris les céréales) et des champignons symbiotiques permettent la formation de mycorhizes. Cet autre type d'association symbiotique permet à la plante d'absorber plus de nutriments au niveau du sol. La structure des facteurs Myc est très semblable à celle des facteurs Nod (Maillet *et al.* 2011). Parce que la reconnaissance des facteurs Myc par les plantes implique une voie de signalisation déjà présente chez les céréales, les rendre fixatrices d'azote de l'air par génie génétique sera peut être moins difficile que ce qui était envisagé à l'origine.

La plupart des *Rhizobium* pénètrent à l'intérieur des cellules de la racine au niveau des poils absorbants par le biais d'une structure cellulaire complexe appelée cordons d'infection. Bien que plus de recherches soient nécessaires pour comprendre les mécanismes de cette infection, certaines légumineuses et la plupart des plantes à actinorhizes sont colonisées par des microorganismes symbiotiques qui entrent directement par des blessures au niveau de l'épiderme de la racine (Charpentier et Oldroyd, 2010). Cette voie d'entrée beaucoup plus simple pourrait être utilisée pour former par la suite des nodosités sachant que les hormones qui contrôlent leur développement se retrouvent chez toutes les plantes. Il est également bien connu depuis plus de cent ans que des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique vivent en association avec les racines des céréales. Ces bactéries sont bénéfiques à la plante parce qu'elles fixent l'azote ou parce qu'elles libèrent des molécules. Elles sont par ailleurs vendues commercialement comme bio-fertilisants, bien qu'il soit difficile de savoir si elles favorisent leur croissance. Il est donc important de mieux étudier le mode d'action de ces bio-stimulants (Yanni *et al.* 2011).

Une autre approche consisterait à exprimer les gènes codant le complexe enzymatique de la nitrogénase dans les chloroplastes. En effet les chloroplastes sont considérés comme étant originellement des bactéries qui ont colonisé la cellule végétale. Il est donc logique de penser que faire produire une enzyme bactérienne comme la nitrogénase dans ces organites sera plus

⁸ Les actinorhizes sont des nodosités fixatrices d'azote qu'on trouve au niveau des racines des plantes angiospermes dites actinorhiziennes. Ces plantes ont la capacité de s'associer avec des bactéries actinomycètes filamenteuses du sol du genre *Frankia* pour produire des actinorhizes. Ce sont essentiellement des arbres ou arbustes telles que les aulnes, le myrte des marais, l'argousier, l'olivier de Bohème.

aisée (Dixon *et al.* 1997). De plus, la bonne connaissance de la structure des gènes codant ce complexe qui contient seulement trois protéines et des étapes intervenant au cours de sa synthèse, rendent tout à fait possible une telle transgénèse. Il restera à trouver dans les chloroplastes les conditions permettant d'abaisser les teneurs en oxygène nécessaires à son bon fonctionnement. Bien que les chloroplastes libèrent des quantités importantes d'oxygène au cours de la photosynthèse, il existe dans le génome des chloroplastes des protéines insensibles à l'oxygène qui ressemblent à la nitrogénase (Muraki *et al.* 2010). De plus chez certaines cyanobactéries⁹, les cellules peuvent assurer la photosynthèse et la fixation d'azote à des périodes différentes.

L'ensemble de ces approches bien que nécessitant encore un investissement en recherche important serait en mesure même si les quantités d'azote fixées sont faibles, d'apporter des solutions pour améliorer l'EUA chez un grand nombre de plantes cultivées.

6. Conclusions

En ce qui concerne l'amélioration des plantes de grande culture pour la tolérance aux stress abiotiques, l'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote, est devenue la deuxième priorité après la sécheresse aussi bien dans le secteur privé que dans la recherche publique. Des progrès ont déjà été réalisés par sélection conventionnelle. Que ce soit chez le blé ou chez le maïs, les variétés modernes utilisent mieux l'azote. De plus, il existe une variabilité génétique assez importante pour ce caractère. Des progrès supplémentaires et surtout plus rapides sont attendus par l'utilisation du génie génétique ou de la sélection assistée par marqueurs (SAM). Ils seront plus lents sans la mise en œuvre de la transgénèse : le blocage des plantes transgéniques dans notre pays risque donc de priver notre agriculture de variétés absorbant et valorisant bien l'azote, d'un grand intérêt pour une agriculture durable.

Un grand nombre d'études ont été menées au cours des deux dernières décennies pour identifier à l'aide d'approches agronomiques, physiologiques et génétiques, les étapes limitantes de l'efficacité d'utilisation de l'azote, à la fois chez les plantes modèles et chez les espèces cultivées. Pour mieux identifier les bases génétiques et physiologiques de l'efficacité d'utilisation de l'azote, on dispose maintenant de nombreux outils comme des mutants, des lignées recombinantes pour la détection de QTL, des protocoles de transformation relativement rapides et des bases de données physiologiques, biochimiques et génomiques (marqueurs moléculaires, QTL, expression de gènes, séquences de génomes) pour développer des approches de biologie des systèmes (Hirel *et al.* 2007).

Cependant, les connaissances acquises en génétique et en physiologie pour identifier les étapes clés impliquées dans le contrôle de l'efficacité d'utilisation de l'azote sont encore incomplètes. Il s'agit en effet d'un caractère complexe, contrôlé par de nombreux gènes, et les mécanismes de régulation impliqués dans l'absorption de l'azote et l'utilisation sont spécifiques à chaque espèce voire à chaque génotype (Hirel *et al.* 2007). En outre, leur importance dépend beaucoup du milieu, ce qui nécessite de prendre en compte les multiples interactions existant entre les différents génotypes et leur environnement (Pilbeam, 2011).

⁹ Les cyanobactéries sont une sous-classe de bactéries autrefois appelées algues bleu-vert.

Au niveau des cultures proprement dites, seuls des modèles agronomiques prédictifs utilisant des paramètres biologiques et agronomiques appropriés et tenant compte de l'influence du milieu devraient permettre d'obtenir une vue intégrée des différents paramètres pouvant influencer l'efficacité d'utilisation de l'azote (McCown *et al.* 1996). L'un des principaux défis dans l'avenir sera également de développer des systèmes fiables d'aide à la décision en utilisant des capteurs (Samborski *et al.* 2009) et des outils de diagnostic biologique pour l'agriculture de précision, afin d'optimiser l'application d'azote. En outre, la mise en place de ces modèles prédictifs devra être élargie à l'étude de l'écologie de la zone de culture, afin d'obtenir une meilleure compréhension de la façon dont le cycle de l'azote est géré par l'ensemble des organismes à l'échelle de l'écosystème (Van der Heidjen *et al.* 2008).

En développant une approche pluridisciplinaire, intégrant la physiologie, la génomique, la génétique, la physiologie, la modélisation et l'agronomie, aussi bien du point de vue fondamental que du point de vue appliqué, et en mettant à profit la variabilité génétique existante ou qui sera créée, il sera possible de mieux décrypter les bases génétiques et physiologiques de l'efficacité d'utilisation de l'azote. Cette approche multidisciplinaire permettra 1) d'identifier de façon plus complète les allèles de gènes les plus importants pour les utiliser en génie génétique ou en SAM, 2) de définir des marqueurs biologiques prédictifs pour les sélectionneurs afin de sélectionner de façon plus efficace les génotypes ayant une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote, 3) de fournir des outils aux agriculteurs permettant de suivre et d'ajuster la fertilisation azotée organique ou minérale pour obtenir des rendements maximum compatibles avec une stratégie de pratiques agricoles durables respectueuses de l'environnement.

Références

- Ameziane, R.; Bernhard, K.; Lightfoot, D. Expression of the bacterial *gdhA* gene encoding a NADPH-glutamate dehydrogenase in tobacco affects plant growth and development. *Plant Soil* 2000, 221, 47-57.
- Andrews, M.; Hodge S.; Raven J.A. Positive plant microbial reactions *Ann. Appl. Biol.* 2010, 157, 317-320.
- Beatty, P.H.; Good, A.G.; Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science* 2011, 333, 416-417.
- Bertin, P.; Gallais, A. Physiological and genetic basis of nitrogen use efficiency in maize. II. QTL detection and coincidences. *Maydica* 2001, 46, 53-68.
- Bi, Y.M.; Kant, S.; Clark, J.; Gidda, S.; Ming, F.; Xu, J.; Rochon, A.; Shelp, B.J.; Hao, L.; Zhao, R.; *et al.* Increased nitrogen use efficiency in transgenic rice plants over-expressing a nitrogen-responsive early nodulin gene identified from rice expression profiling. *Plant Cell Environ.* 2009, 32, 1749-1760.
- Brauer, E.K.; Rochon, A.; Bi, Y.M.; Bozzo, G.G.; Rothstein, S.J.; Shelp, B. Reappraisal of nitrogen use efficiency in rice overexpressing glutamine synthetase 1. *Physiol. Plantarum.* 2011, 141, 361-372.
- Cameron, S.G.; Schipper, L.A. Nitrate removal and hydraulic performance of organic carbon for use in denitrification beds. *Ecol. Eng.* 2010, 36, 1588-1595.
- Charpentier, M.; Oldroyd, G. *Curr. Opin.* How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Plant Biol.* 2010, 13, 556-564.
- Dixon, R.; Cheng, Q.; Shen, G-F.; Day, A.; Dowson-Day, M. Nif gene transfer and expression in chloroplast: prospects and problems. *Plant Soil* 1997, 194, 193-203.
- Fontaine, J.X.; Ravel, C.; Pageau, K.; Heumez, E.; Dubois, F.; Hirel, B.; Le Gouis, J. A quantitative genetic study for elucidating the contribution of glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and other nitrogen-related physiological traits to the agronomic performance of common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2009, 119, 645-662.
- Fuentes, S.I.; Alen, D.J.; Ortiz-Lopez, A.; Hernandez, G. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *J. Exp. Bot.* 2001, 52, 1071-1081.

- Gallais, A.; Coque, M. Genetic variation and selection for nitrogen use efficiency in maize: A synthesis. *Maydica* 2005, 50, 531-537.
- Gallais, A.; Hirel, B. An approach of the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *J. Exp. Bot.* 2004, 55, 295-306.
- Galloway, J.N.; Townsend, A.R.; Erismann, J.W.; Bekunda, M.; Cai, Z.; Freney, J.R.; Martinelli, L.A.; Seitzinger, S.P.; Sutton, M.A. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 2008, 320, 889-892.
- Gomez de Oliveira Dal'Molin, C.G.; Quek, L.E.; Palfreyman, R.W.; Brumbley, S.M.; Nielsen, L.K. AraGEM, a genome-scale reconstruction of the primary metabolic network in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2010, 152, 579-589.
- Good, A.G.; Johnson, S.J.; De Pauw, M.; Carroll, R.T.; Savodiv, N.; Vidmar, J.; Lu, Z.; Taylor, G.; Stroehrer, V. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Can. J. Bot.* 2007, 85, 252-262.
- Gutiérrez, R.A.; Gifford, M.L.; Poultney, C.; Wang, R.; Shasha, D.E.; Coruzzi, G.M.; Crawford, N.M. Insights into the genomic nitrate response using genetics and the sungear software system. *J. Exp. Bot.* 2007, 58, 2359-2367.
- Hirel, B.; Lea, P.J. The molecular genetics of nitrogen use efficiency in crops. In *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*; Hawkesford, M.J., Barraclough, P.B., Eds.; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, 2011; pp.139-164.
- 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, 2369-2387.
- Lammerts van Buren, E.T.; Jones, S.S.; Tamn, L.; Murphy, K.M.; Myers, J.R.; Leifert, C.; Mesmer, M.M. The need to breed crop varieties suitable for organic farming, using wheat, tomato and broccoli as examples: A review. *NJAS Wageningen J. Life Sci.* 2010, doi: 10.1016/j.njas.2010.04.001.
- Lisec, J.; Meyer, R.C.; Steinfath, M.; Redestig, H.; Becher, M.; Witucka-Wall, H.; Fienh, O.; Törjék, O.; Selbig, J.; Altman, T.; *et al.* Identification of metabolic and biomass QTL in Arabidopsis thaliana in a parallel analysis of RIL and IL populations. *Plant J.* 2008, 53, 960-972.
- Liu, Y.Y.; Wu, L.H.; Baddeley, J.A.; Watson, C.A. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2011, 31, 155-172.
- London, J.G. Nitrogen study fertilizes fears of pollution. *Nature* 2005, 433, 791.
- Man, H.M.; Boriel, R.; El-Khatib, R.; Kirby, E.G. Characterization of transgenic poplar with ectopic expression of pine cytosolic glutamine synthetase under conditions of varying nitrogen ability. *New Phytol.* 2005, 167, 31-39.
- Maillet, F.; Poinot, V.; André, O.; Puech-Pagès, V.; A.; Haouy, A.; Gueunier, M.; Cromer, L.; Giraudet, D.; Formey, D.; Niebel, A.; Martinez, E.A.; Driguez, H.; Bécard, G.; Dénarié, J. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 2011, 459, 58-63.
- Martin, A.; Lee, J.; Kichey, T.; Gerentes, D.; Zivy, M.; Tatou, C.; Balliau, T.; Valot, B.; Davanture, M.; Dubois, F.; *et al.* Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize (*Zea mays* L.) are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell* 2006, 18, 3252-3274.
- Masclaux-Dubresse, C.; Daniel-Vedele, F.; Dechorgnat, J.; Chardon, F.; Gaufichon, L.; Suzuki, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable productive agriculture. *Ann. Bot.* 2010, 105, 1141-1157.
- McCown, R.L.; Hammer, G.L.; Hargreaves, J.N.G.; Holzworth, D.P.; Freebairn, D.M. APSIM: A novel software system for model development, model testing and simulation in agricultural systems research. *Agr. Syst.* 1996, 50, 255-271.
- Mulvaney, R.L.; Khan, S.A.; Ellsworth, T.R. Synthetic nitrogen depleted soil nitrogen: A global dilemma for sustainable cereal production. *J. Environ. Qual.* 2009, 38, 2295-2314.
- Muraki, N.; Nomata, J.; Ebata, K.; Mizoguchi, T.; Sihba, T.; Tamiaki, H.; Kurisu, G.; Fujita, Y. X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase *Nature* 2010, 465, 110-115.

- Obara, M.; Kajiura, M.; Fukuta, Y.; Yano, M.; Hayashi, M.; Yamaya, T.; Sato, T. Mapping of QTL associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 2001, 52, 1209-1217.
- Pathak, R.R.; Lochab, S.; Raghuram, N. In *Plant Systems. Improving Plant Nitrogen Use Efficiency*. Moo-Young M., Eds.; *Comprehensive Biotechnology*, Second Ed.; 2011, 4, pp. 209-218.
- Pilbeam, D.J. The utilization of nitrogen by plants: A whole plant perspective. In *Annual Plant Reviews, Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-genomic Era*; Foyer, C.H., Zhang, H., Eds.; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, 2011; Volume 42, pp. 305-352.
- Plomion, C.; Bahrman, N.; Costa, P.; Frigério, J.M.; Gerber, S.; Gion, J.M.; Lalanne, C.; Madur, D.; Pionneau, C. Proteomics for genetic and physiological studies in forest trees: Application in maritime pine. In *Molecular Genetics and Breeding of Forest Trees*; Kumar, S., Fladung, M., Eds.; Haworth Press: New York, NY, USA, 2004; pp 53-80.
- Quraishi, U.M.; Abrouk, M.; Murat, F.; Pont, C.; Foucrier, S.; Demaizieres, G.; Confolent, C.; Rivière, N.; Charmet, G.; Paux, E.; *et al.* Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-meta QTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution. *Plant J.* 2011, 65, 745-756.
- Ramos, C. Effect of agricultural practices on the nitrogen losses to the environment. *Fertilizer Res.* 1996, 43, 183-189.
- Raun, W.R.; Johnson, G.V. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agron. J.* 1999, 91, 357-363.
- Reganold, J.P.; Papendick, R.I.; Parr, F.F. Sustainable agriculture. *Sci. Am.* 1990, 262, 112-120.
- Rengel, Z. Breeding for better symbiosis. *Plant Soil* 2002, 245, 147-162.
- Tilman, D.; Cassman, K.G.; Matson, P.A.; Naylor, R.; Polasky, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 2002, 418, 671-677.
- Salvi, S.; Tuberosa, R. Cloning QTL in Plants. In *Genomics-Assisted Crop Improvement*; Varshney, R.K., Tuberosa, R., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; Volume 1, pp. 207-226.
- Samborski, S.M.; Tremblay, N.; Fallon, E. Strategies to make use of plant sensors-based diagnostic information for nitrogen recommendations. *Agron. J.* 2009, 101, 800-816.
- Umar, A.S.; Iqbal, M. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2007, 27, 45-57.
- Van der Heidjen, M.G.A.; Bardgett, R.D.; van Straalen, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 2008, 11, 296-310.
- Vincent, R.; Fraiser, V.; Chaillou, S.; Limami, M.A.; Deléens, E.; Phillipson, B.; Douat, C.; Boutin, J.P.; Hirel, B. Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta* 1997, 201, 424-433.
- Xu, Y. Quantitative trait loci: Separating, pyramiding, and cloning. *Plant Breed. Rev.* 1997, 15, 85-139.
- Yanagisawa, S.; Akiyama, A.; Kisaka, 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, 7833-7838.
- Yanni, Y.G.; Dazzo, F.B.; Zidan, M. Beneficial endophytic rhizobia as biofertilizer inoculants for rice and the spatial ecology of this bacteria-plant association. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* Springer, 2011; pp. 265-294.
- Yu, J.; Buckler, E.S. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Cur. Opin. Biotech.* 2006, 17, 155-160.