

Applications de la transgénèse à l'amélioration variétale du riz

Donaldo Meynard¹
 Delphine Mieulet¹
 Rania Ben Saad²
 Jean-Christophe Breitler¹
 Julie Petit¹
 Pascal Gantet³
 Afif Hassairi⁴
 Emmanuel Guiderdoni¹

¹ Cirad
 UMR AGAP
 TAA108/03
 Avenue Agropolis
 34398 Montpellier cedex 5
 France
 <donaldo.meynard@cirad.fr>
 <delphine.mieulet@cirad.fr>
 <jcbreitler@greenfeel.eu>
 <julie.petit@cirad.fr>
 <emmanuel.guiderdoni@cirad.fr>

² Centre de biotechnologie de Sfax
 Route BP « 1177 »
 3018 Sfax
 Tunisie
 <raniabensaad@yahoo.fr>

³ Université Montpellier II
 International Joint Laboratory "Rice
 Functional Genomics and Plant
 Biotechnology" (IRD, UM2, AGI, VAAS,
 USTH)
 Agricultural Genetics Institute
 Nat. Key Lab for Plant Cell Biotechnology
 Pham Van Dong Road
 Co Nhue
 Tuliem
 Hanoi
 Vietnam
 <pascal.gantet@univ-montp2.fr>

⁴ King Saud University
 College of Food and Agricultural Sciences
 Department of Plant Production
 Room No. AA 107
 P.O. Box 2460
 11451 Riyadh
 Arabie Saoudite
 <afif.hassairi@gmail.com>

Résumé

Depuis l'obtention de la première plante transgénique de riz en 1988, de larges progrès ont été accomplis pour manipuler les caractères d'intérêt agronomique par ingénierie génétique chez cette plante d'importance alimentaire, économique et culturelle majeure. Les caractères concernés vont de la résistance aux insectes ravageurs et aux pathogènes fongiques, bactériens et viraux à la tolérance vis-à-vis des contraintes abiotiques (toxicités et carences minérales, température excessive ou basse, excès ou déficit en eau) en passant par les qualités nutritives ou industrielles du grain. Des portions entières de voies métaboliques peuvent à présent être finement manipulées, permettant par exemple la production de β -carotène (provitamine A) dans l'albumen du grain, qui en est naturellement dépourvu, ou l'accumulation des enzymes de la photosynthèse C4 dans des tissus foliaires précis. La production de molécules d'intérêt thérapeutique ou industriel dans le grain a aussi été réalisée. Bien que certaines de ces innovations soient prêtes à être transférées dans le champ du riziculteur depuis plusieurs années, les politiques publiques sont encore hésitantes à franchir le pas. Ce retard relatif a été mis à profit pour conduire de nombreuses études sur les impacts alimentaires et environnementaux liés à la consommation et au déploiement de ces nouvelles cultures.

Mots clés : amélioration génétique ; qualité des produits ; riz ; stress abiotiques ; stress biotiques ; transformation génétique.

Thèmes : amélioration génétique ; pathologie ; productions végétales.

Abstract

Use of genetic engineering in rice improvement

Since the first recovery of a transgenic rice plant in 1988, major progress has been made in manipulating traits of interest through genetic engineering of this plant of high sociological, cultural and economic importance. These traits encompass resistance to insect pests, and fungal, bacterial and viral pathogens, tolerance to abiotic constraints (mineral toxicities and deprivation, low or high temperatures, water excess or shortage) and the nutritional or industrial qualities of the grain. Last but not least, engineering metabolic pathways in a tissue-specific manner have led, for instance, to the accumulation of carotene in the rice endosperm as well as of C4 photosynthetic enzymes in appropriate anatomical compartments of the leaf. Other projects aim at producing molecules for therapeutic or industrial use in the seed. Although some of these innovations have been readily transferable to rice farmers for several years, public policies are still hesitant. The scientific community has taken advantage of this to study the impact on the alimentation and the environment related to the consumption or the deployment of the future engineered crops.

Key words: abiotic stress; biotic stress; genetic engineering; plant breeding; product quality; rice.

Subjects: genetic improvement; pathology; vegetal productions.

Tirés à part : E. Guiderdoni

doi: 10.1684/agr.2013.0625

Pour citer cet article : Meynard D, Mieulet D, Ben Saad R, Breitler JC, Petit J, Gantet P, Hassairi A, Guiderdoni E, 2013. Applications de la transgénèse à l'amélioration variétale du riz. *Cah Agric* 22 : 494-505. doi : 10.1684/agr.2013.0625

Après l'obtention en 1988 des premières plantes transgéniques de riz par électroporation de protoplastes, le transfert de gènes d'intérêt agronomique chez le riz a rapidement suivi et s'est depuis diversifié tout en bénéficiant d'une amélioration constante des méthodes de transgénèse (Tyagi et Mohanty, 2000 ; Bajaj et Mohanty, 2005). Les premières plantes de riz exprimant une entomotoxine de *Bacillus thuringiensis* et tolérantes aux insectes foreurs des tiges et aux mineurs des feuilles ont ainsi été testées en laboratoire en 1993 (Fujimoto *et al.*, 1993) puis au champ, quelques années plus tard (Tu *et al.*, 2000 ; Ye *et al.*, 2001). De 1985 à 1999, la fondation Rockefeller a fortement appuyé des projets de transferts de gènes visant une tolérance accrue aux contraintes abiotiques (sécheresse, salinité) et agressions biotiques (insectes foreurs, piqueurs-suceurs et défoliateurs, virus, champignons et bactéries) et à l'amélioration de la qualité nutritionnelle du grain. Le programme le plus emblématique dans cette dernière catégorie est sans doute celui visant la mise au point du riz enrichi en β -carotène, le riz doré, qui a ensuite été appuyé par la Commission européenne (Ye *et al.*, 2000).

Résistance aux insectes ravageurs

Les premiers gènes d'intérêt à avoir été transférés dans le génome du riz sont les gènes *cry* de la bactérie *B. thuringiensis* codant une δ -endotoxine toxique pour certains insectes. Ces gènes ont d'abord été introduits dans des riz de type *japonica* (Fujimoto *et al.*, 1993) puis *indica* (Wunn *et al.*, 1996). Des versions synthétiques de ces gènes, présentant une préférence de codon adaptée à leur expression dans les plantes des gènes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry2A* et *cry9C*, ont été introduites seules, en combinaison ou en associant des gènes codant pour des protéines entomotoxiques ayant un autre mode d'action comme les protéines vip de *B. thuringiensis* (Chen

et al., 2010) ou des inhibiteurs de protéases ou lectines végétaux. Les essais au champ, réalisés dès 1997 en Chine (Ye *et al.*, 2001), ont démontré l'efficacité de ces stratégies pour la protection du riz contre différentes catégories de ravageurs (Shu *et al.*, 2000). Leur utilisation préserve, en outre, la diversité des insectes non cibles (High *et al.*, 2004) tout en évitant l'épandage de pesticides très nocifs pour la santé des riziculteurs (Huang *et al.*, 2005). Si les stratégies d'expression des gènes *cry* ont généralement fait appel à des promoteurs constitutifs (ubiquitine du maïs) ou spécifique des tissus verts (PEP carboxylase du maïs), une approche originale a consisté à contrôler leur expression par un promoteur inducible par la blessure (inhibiteur de protéases du maïs) (Cordero *et al.*, 1994). Cette dernière stratégie permet d'éviter une accumulation en continu dans la plante et dans les parties destinées à la consommation humaine, l'albumen du grain, ou pouvant entrer en contact avec des insectes non cibles, comme le pollen (Breitler *et al.*, 2001, 2004) (figure 1). L'autre catégorie de gènes codant des protéines à activité entomotoxique ayant été introduites chez le riz est celle que forment les gènes de lectines, d'albumines et d'inhibiteurs de protéases d'origine végétale (Duan *et al.*, 1996 ; Irie *et al.*, 1996 ; Xu *et al.*, 1996a ; Lee *et al.*, 1999 ; Mochizuki *et al.*, 1999 ; Vila *et al.*, 2005 ; Yarasi *et al.*, 2008). Les inhibiteurs de protéases permettent d'empêcher l'assimilation des acides aminés essentiels par les jeunes larves d'insectes, ralentissent leur développement, et peuvent provoquer leur mort. Le premier riz exprimant un inhibiteur de protéases testé au champ et conférant un bon niveau de protection contre les foreurs des tiges a été conçu par intégration dans son génome du gène *pinII* de la pomme de terre placé sous le contrôle de son propre promoteur, qui présente l'intérêt d'être inducible par blessure, et de l'intron d'actine 1 du riz (Duan *et al.*, 1996). Enfin, une autre stratégie, récemment mise au point pour lutter contre les nématodes ou les insectes ravageurs, consiste à faire s'exprimer dans la plante des ARN doubles brins dont la dégradation en petits ARN après ingestion par le ravageur va conduire

à l'inhibition spécifique de gènes essentiels à son développement par la mise en place d'une interférence de l'ARN (Zha *et al.*, 2011).

Résistance aux pathogènes

Différentes stratégies ont été utilisées pour lutter contre les maladies fongiques (*Magnaporthe*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*), bactériennes (*Xanthomonas*) et virales du riz (*Rice Tungro Virus* [RTSB et RTSV], *Rice Yellow Mottle Virus* [RYMV], *Rice Stripe Virus* [RSV], *Rice Hoja Blanca Virus* [RHBV], *Rice Ragged Stunt Virus* [RRSV]). Pour les maladies provoquées par les bactéries et les champignons, les meilleurs niveaux de protection ont pour le moment été ceux qui ont été obtenus grâce à des gènes de résistance naturelle isolés à partir de certaines variétés de riz ou de ses espèces apparentées. Une meilleure connaissance des événements moléculaires impliqués dans les interactions plante-pathogène a permis d'identifier des gènes clés et centraux régulant les processus de défense. L'expression constitutive du gène *AtNPR1* d'*Arabidopsis* chez le riz a ainsi permis l'expression préventive des gènes de défense endogènes normalement induits par l'acide salicylique, une hormone végétale de stress, et conférant ainsi un niveau plus élevé de résistance aux pathogènes fongiques et bactériens (Quilis *et al.*, 2008). La manipulation de la réponse hypersensible (immune) de la cellule, conduisant la plante à résister aux maladies grâce à l'accumulation de peroxyde d'oxygène et de composés phénoliques à pouvoir antibiotique, et à une modification structurale de la paroi dès les premiers stades de l'infection, a été également explorée (Li *et al.*, 2011). L'expression de gènes dérivés du pathogène s'est montrée efficace pour créer des résistances contre les virus tels que les RTSV, RTBV et le RYMV en exprimant respectivement une réplicase impliquée dans la multiplication du génome viral (Huet *et al.*, 1999), une protéine de nucléocapside (Lentini *et al.*, 2003) et l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus (Pinto *et al.*, 1999). Une autre

stratégie de lutte contre la forme bacille du Tungro (RTBV) a consisté à surexprimer dans la plante des facteurs de transcription qui vont réguler l'activité du promoteur du virus (Dai *et al.*, 2008).

Si la surexpression de certains gènes peut conduire à une augmentation de la tolérance croisée aux stress biotiques et abiotiques (par exemple, le gène *OsBIRF 1* codant pour une

protéine RING-H2) (Liu *et al.*, 2008), la surexpression d'un même gène peut parfois conduire à des effets antagonistes pour la sensibilité à différents types de stress. Ainsi, l'expression du gène d'inhibiteur de carboxypeptidase de la pomme de terre protège le riz contre les pathogènes fongiques, mais conduit à un développement plus important de larves de foreurs des tiges (Quilis *et al.*, 2007). L'effet de

protection contre les maladies fongiques et bactériennes du gène *AtNPR1*, mentionné plus haut, est contrebalancé par une hypersensibilité au virus du RYMV et aux stress abiotiques (Quilis *et al.*, 2008). Les plantes accumulant la protéine de type 14-3-3 régulatrice de la réponse aux stress *ZmGF14-6* montrent une tolérance accrue à la sécheresse mais également une hypersensibilité aux



Figure 1. Modification de la résistance du riz vis-à-vis des insectes ravageurs : expression inducible par l'attaque des larves foreuses de tiges de la pyrale *Chilo suppressalis*, d'un gène d'endotoxine de *Bacillus thuringiensis* (Breitler *et al.*, 2000, 2001, 2004).

Figure 1. Modification of rice resistance to insect pests: expression induced by the attack of *Chilo suppressalis* pyral stem-boring larvae, from an endotoxic *Bacillus thuringiensis* genus (Breitler *et al.*, 2000, 2001, 2004).

A) Larve de pyrale dans un entre-nœud de la tige de riz causant le symptôme du cœur mort (infestation au stade tallage) ou de la panicule blanche (infestation à floraison) ; **B)** deux constructions ont été réalisées où une séquence synthétique optimisée du gène *cry1B* de *B. thuringiensis* codant pour une protéine crystal à activité entomopathogène a été placée sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (*ubi1* du maïs) ou inducible par blessure (*maize protease inhibitor* [*mpi*]) ; **C)** la protéine Cry1B (flèche, ici visualisée spécifiquement grâce à des anticorps au sein des protéines totales solubles) s'accumule après blessure dans le riz (haut) quel que soit l'âge du tissu foliaire (B : blessé ; NB : non blessé) (bas) ; **D)** la protéine Cry1B est, en revanche, absente du pollen (haut) et de l'albumen (*alb*) et de l'embryon (*emb*) du grain (bas) lorsque le gène est contrôlé par le promoteur inducible *mpi* ; **E)** les plantes accumulant la toxine Cry1B sont résistantes (gauche) à la pyrale contrairement au témoin variétal (droite).

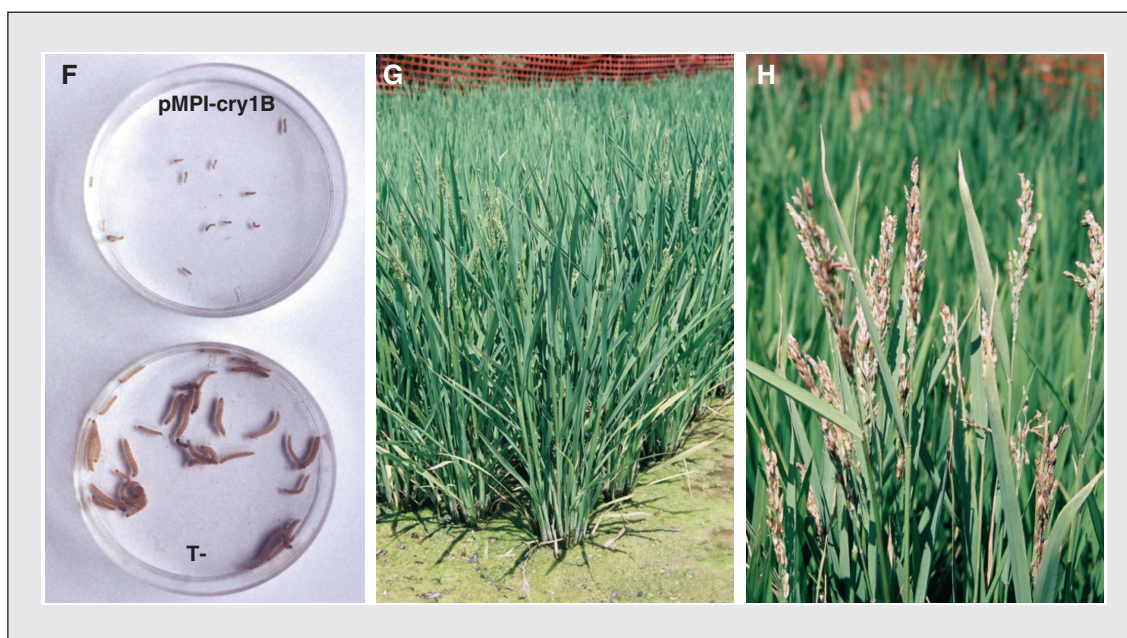


Figure 1. (suite) : F) larves de pyrale récupérées après le bio-essai : les larves déposées sur les plantes exprimant la toxine ne se sont pas développées et sont mortes (haut) tandis que les larves déposées sur les plantes témoins ont changé de stade et sont vivantes (bas) ; **G)** les lignées exprimant la toxine cry1B sont totalement protégées en conditions de champ tandis que les plantes témoins présentent les symptômes d'attaque par *Chilo suppressalis* (**H**) (**C, D, F** et **E** reproduits de Breidler *et al.*, 2001 et Breidler *et al.*, 2000, respectivement).

attaques de *Fusarium* et de *Magnaporthe* (Campo *et al.*, 2012). Le dialogue croisé (*cross-talk*) entre les voies de réponse aux stress biotiques et abiotiques, qui peut conduire à des réactions opposées et imprévues, est encore insuffisamment pris en compte dans les évaluations des plantes transgéniques. Les analyses de transcriptome des plantes transgéniques qui permettent de suivre l'expression simultanée de l'ensemble des gènes se systématisent et devraient apporter un éclairage sur l'ensemble des voies modifiées par la surexpression d'un gène dans la plante.

Tolérance aux contraintes abiotiques

Des tolérances accrues aux contraintes abiotiques (toxicité et carences minérales, excès ou déficit en eau, hautes et basses températures, etc.) ont été recherchées chez le riz comme chez les autres plantes. En premier lieu, des approches classiques de surexpression constitutive ou inductible par le

stress de gènes, dont le produit confère une tolérance aux stress par protection des structures cellulaires ou modification du transport d'eau de minéraux ou d'eau, ont été tentées. Dans cette catégorie rentrent par exemple les protéines *late embryogenesis abundant* (LEA) (Xu *et al.*, 1996b ; Babu *et al.*, 2004 ; Kathuria *et al.*, 2009), les protéines de choc thermique (HSP) (Murakami *et al.*, 2004) ou les aquaporines (Katsuhara *et al.*, 2003). Des gènes codant pour la synthèse d'osmoprotectants comme la proline (Hur *et al.*, 2004 ; Su et Wu, 2004) et la glycine bêtaïne (Sakamoto et Murata, 2002 ; Kathuria *et al.*, 2009), ou des sucres comme le tréhalose (Garg *et al.*, 2002 ; Jang *et al.*, 2003) ont aussi été utilisés. Dans un second temps, des gènes dont les produits sont impliqués dans la perception et la transduction du signal de réponse au stress ont été identifiés et utilisés en transgène : ce sont principalement des kinases comme MAPK (Saijo *et al.*, 2000 ; Xiong et Yang, 2003) et CPDK (Asano *et al.*, 2011), des protéines régulant des voies de signalisation par interaction protéine-protéine comme les protéines SAP (Kanneganti et Gupta, 2008 ; Ben Saad *et al.*, 2012) et DIR (Gao *et al.*, 2011) ou des

facteurs de transcription tels DREB (Dubouzet *et al.*, 2003 ; Oh *et al.*, 2005 ; Oh *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008), AP37 (Oh *et al.*, 2009), NAC (Hu *et al.*, 2006, 2008 ; Takasaki *et al.*, 2010), MYB (Ma *et al.*, 2009 ; Jeong *et al.*, 2010), HARDY (Karaba *et al.*, 2007), ZIP23 (Xiang *et al.*, 2008), ERF (Quan *et al.*, 2010) et DST (Huang *et al.*, 2009). Ces dernières stratégies permettent à la fois de réguler l'expression coordonnée d'un grand nombre de gènes de réponse aux stress et également de conduire à des tolérances à plusieurs contraintes abiotiques, les voies de réponse à différents stress étant souvent communes, au moins pour partie. Si la liste est longue des publications rapportant le transfert de gènes qui confèrent au riz une meilleure tolérance aux stress abiotiques en conditions de laboratoire ou de serre, les exemples de tolérance vérifiée au champ sous divers scénarios de stress restent encore limités : seuls les gènes *NAC* (Hu *et al.*, 2006 ; Jeong *et al.*, 2010), *LEA* (Xiao *et al.*, 2007) et *AP37* (Oh *et al.*, 2009) ont montré leur efficacité en conditions naturelles. L'analyse fine des résultats a d'abord permis de conclure que la manipulation d'un seul gène, même jouant un rôle central

dans la réponse à différents stress abiotiques, pourrait difficilement permettre une adaptation complète de la plante aux nombreux scénarios et combinaisons de stress rencontrés en conditions naturelles. Cependant, des résultats récents semblent montrer qu'un tel objectif pourrait être atteint et cela sans pénalité sur la performance de la plante lorsqu'elle est cultivée en absence de stress (Hu *et al.*, 2006 ; Karaba *et al.*, 2007 ; Oh *et al.*, 2009 ; Jeong *et al.*, 2010 ; Ben Saad *et al.*, 2012). Un intérêt particulier est actuellement porté à l'isolement de gènes de tolérance à partir de plantes extrémophiles qui, en dehors de leurs adaptations morphologiques et ana-

tomiques souvent remarquables, ont aussi vraisemblablement optimisé leurs mécanismes physiologiques de réponse aux stress abiotiques. Ainsi, une étude du transcriptome d'*Aeluropus littoralis*, une graminée halophyte adaptée à pousser en présence de fortes concentrations en sel, a permis d'identifier le gène *AISAP* codant pour une protéine possédant deux domaines en « doigt de zinc », A20 et AN1. L'accumulation de cette protéine dans la plante permet au riz, comme à d'autres plantes (blé dur, tabac), de poursuivre sa croissance par un maintien de la photosynthèse sous différentes contraintes abiotiques sévères (Ben Saad *et al.*, 2012) (figure 2).

Une amélioration de la tolérance aux carences minérales, telles que le manque d'azote et de fer, a également été approchée par la transgénèse. Pour l'azote, l'expression d'un facteur de transcription DOF du maïs a permis d'améliorer significativement son assimilation par activation des gènes de photosynthèse et en modulant l'équilibre de métabolites carbonés et azotés (Kurai *et al.*, 2011). Une autre voie a consisté à exprimer une gène d'alanine aminotransférase d'orge de façon tissu-spécifique (Shrawat *et al.*, 2008). Pour accroître l'absorption de fer, l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores (des molécules facilitant l'assimilation et le

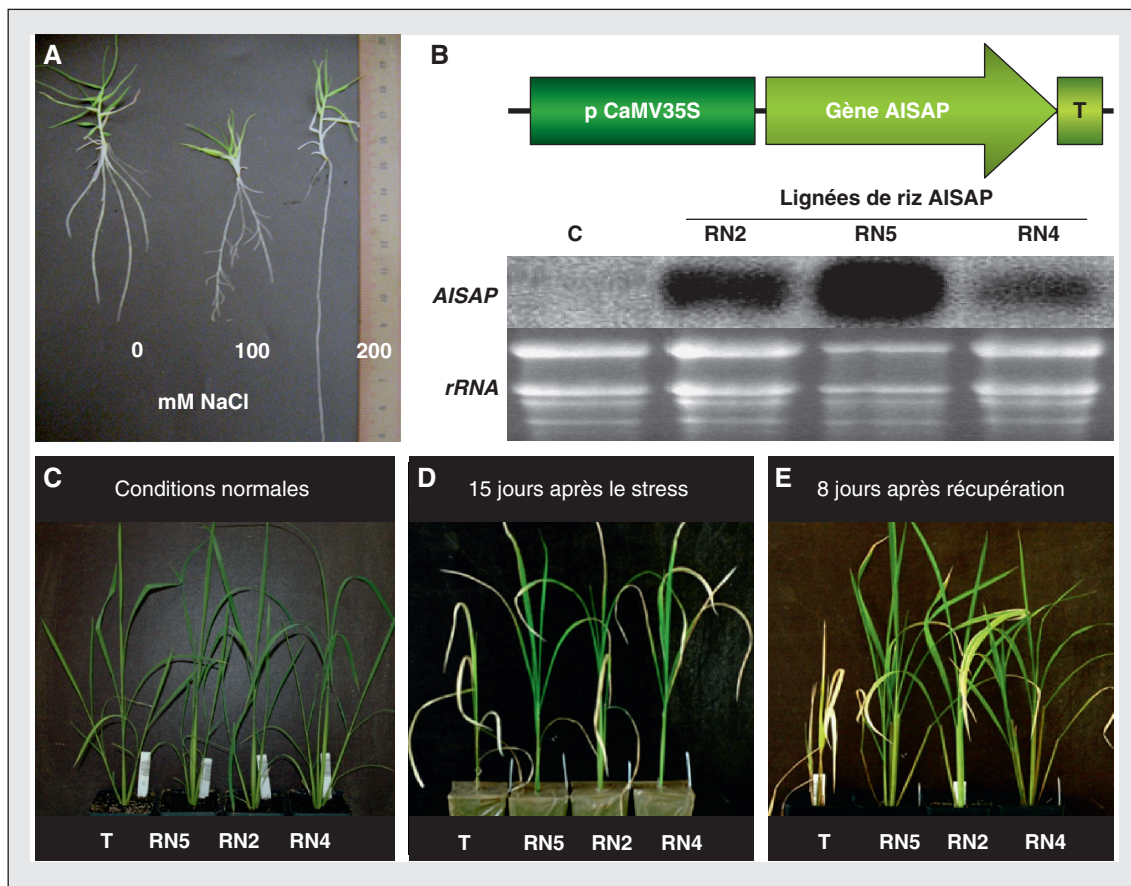


Figure 2. Modification de la tolérance du riz vis-à-vis des contraintes abiotiques : expression d'un gène codant pour une *stress-associated protein* de la graminée halophyte C4 *Aeluropus littoralis*.

Figure 2. Modification of rice tolerance to abiotic constraints: expression of a gene coding for “stress-associated protein” of the C4 grass halophyte *Aeluropus littoralis*.

A) Plante des régions désertiques, *A. littoralis* a une croissance racinaire stimulée en conditions de salinisation (jusqu'à 300 mM) ; **B)** un ADN-T contenant la séquence codante du gène *AISAP* sous le contrôle du promoteur CaMV35 a été transféré chez trois lignées transgéniques de riz cv. Nipponbare, RN2, RN4 et RN5. RN5 montre le niveau le plus élevé d'accumulation des transcrits *AISAP*. **C-H)** L'accumulation constitutive de *AISAP* permet au riz de tolérer des stress abiotiques multiples (salinité, déficit hydrique, choc osmotique, basse température) (Ben Saad *et al.*, 2012), nous montrons ici l'exemple du stress hydrique au travers d'un essai de déficit hydrique du sol contrôlé en pots en conditions de serre, réalisé sur les trois lignées et le témoin variétal. Dans cet essai, la fraction transpirable en eau du sol (FTSW) est amenée à la capacité au champ (FTSW = 1), puis les pots sont enveloppés avec du ruban adhésif de telle manière à ce que les seules pertes en eau soient dues à la transpiration. La teneur en eau du sol est amenée à un niveau proche du point de flétrissement permanent (FTSW = 0,1). Avant le stress, les lignées transgéniques ont un développement comparable au témoin (**C**). Après le stress (**D**), les plantes sont remises en eau et récupèrent pendant une semaine (**E**).

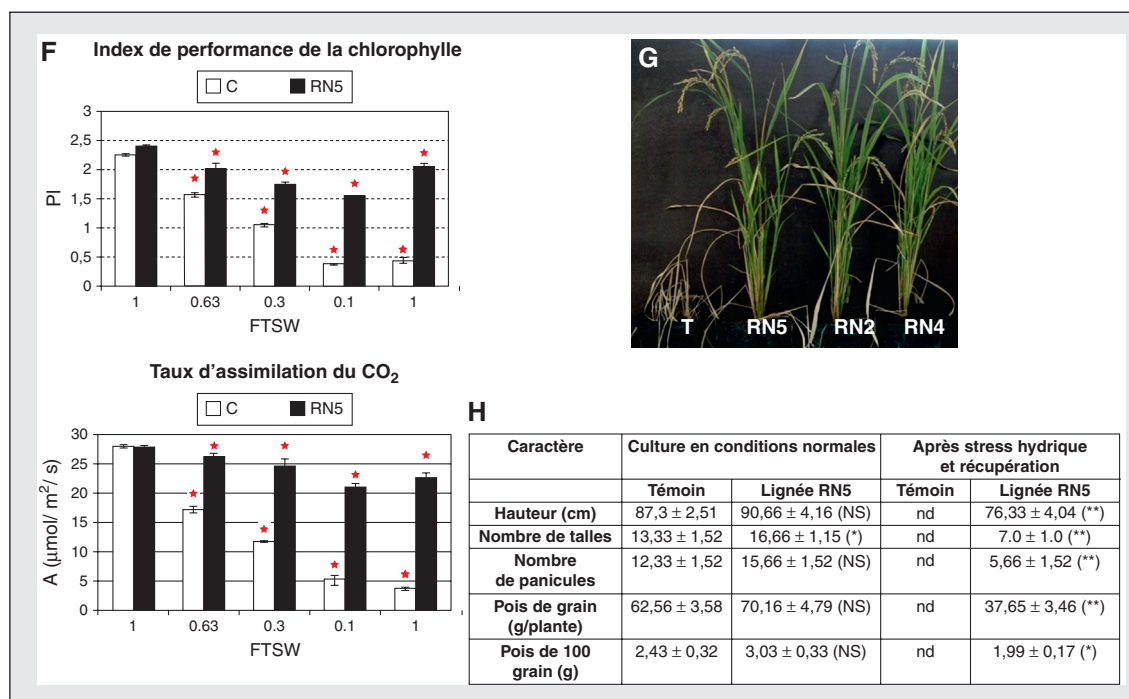


Figure 2. (suite) : Sous stress, les lignées transgéniques (ici illustrées par la lignée RN5) maintiennent une bonne assimilation du CO₂ et l'intégrité de leur appareil photosynthétique, comme attesté par l'index de fluorescence de la chlorophylle (F). Ces paramètres physiologiques retournent à la normale chez le riz *A/SAP* après récupération (FTSW = 1 sur l'histogramme) alors que ceux des plantes témoins restent toujours affectés. Les riz *A/SAP* ont poursuivi leur croissance malgré le stress (G) et produisent 50 % de la récolte obtenue en conditions normales (H) alors que les plantes témoin ne survivent pas (B-H reproduits de Ben Saad *et al.*, 2012).

transport du fer) tels ceux codant la nicotianamine aminotransférase et la nicotianamine synthétase, a été réalisée (Takahashi *et al.*, 2001). Plus récemment, le facteur de transcription *iron deficiency 1* (IDEF1) qui se lie directement à l'élément IDE1 des promoteurs des gènes induits en réponse à la carence en fer et active leur transcription, notamment celle d'un autre facteur de transcription OsIRO2, a été caractérisé. Des plantes de riz transgéniques surexprimant le facteur IDEF1 présentent une tolérance accrue à la déficience en fer qui leur permet de se développer sur des sols calcaires, normalement défavorables à l'absorption du fer par les plantes (Kobayashi *et al.*, 2007).

Amélioration de la qualité nutritionnelle du grain

Les améliorations qualitatives du grain ont visé la modification de l'amidon, et des protéines de réserve, l'augmenta-

tion ou la réduction du niveau de certains acides aminés et la réduction des protéines allergènes naturellement accumulées dans le grain. L'exemple le plus emblématique du succès de la modification de la qualité nutritive du grain de riz est celui qui a été obtenu par le transfert de gènes intervenant dans la biosynthèse du β -carotène ou provitamine A (Burkhardt *et al.*, 1997), aboutissant ainsi à la création très médiatisée du riz doré (*golden rice*). Cette stratégie est destinée à contribuer à pallier la carence en vitamine A, qui touche particulièrement les populations défavorisées du Sud, en complément d'autres approches comme la diversification alimentaire et les programmes de fourniture de vitamine A. Elle a consisté à faire s'accumuler dans l'albumen du riz, qui en est dépourvu, du β -carotène par transfert des gènes intervenant dans sa biosynthèse. La voie de biosynthèse chez les plantes implique l'action successive de cinq enzymes à partir du géranylgeranyl diphosphate (GGPP) : la phytoène synthase (PSY), la phytoène désaturase (PDS), la carotène désaturase

(ZDS), et les lycopène β -cyclase (β -LCY) et hydrolyase (β -HYD) (*figure 3*). Les gènes codants pour ces enzymes sont déjà présents dans le génome du riz mais ne s'expriment pas dans l'albumen du grain. Des études ont montré que la principale barrière à l'accumulation de β -carotène dans l'albumen est l'absence d'accumulation des enzymes PSY et ZDS. Le premier prototype de riz doré a donc consisté à transférer les gènes *psy* de narcisse et le gène *crt1* de la bactérie *Erwinia*, qui convertit directement le phytoène en lycopène et accomplit donc la fonction des gènes *pds* et *zds*. Les gènes *psy* et *crt1* ont été placés sous le contrôle du promoteur de glutéline du riz qui confère une expression spécifique de l'albumen, et du promoteur 35S du CaMV qui confère une expression constitutive. Une autre expérience de cotransformation a associé cet ADN-T avec un autre ADN-T portant le gène β -lcy de narcisse sous le contrôle du promoteur de glutéline du riz. Les résultats ont montré que l'introduction de cette dernière cassette de gènes n'était pas nécessaire à l'accumulation de

β -carotène dans le riz, puisque les activités β -LCY et β -HYD étaient induites dans l'albumen du grain de riz suite à la production de lycopène. Une accumulation de β -carotène de 1,6 à 2 $\mu\text{g/g}$ a été observée dans les grains des meilleurs événements de transformation, démontrant ainsi la faisabilité de la modification (Ye *et al.*, 2000). Il s'est agi ensuite d'augmenter l'expression du gène *crt1* en utilisant une séquence synthétique optimisée pour son expression dans la plante, de remplacer le gène sélectionnable de résistance aux antibiotiques, utilisé pour la sélection des tissus transfor-

més, par le gène *PMI* codant pour la phosphomannose isomérase et cela dans des variétés *indica* élite (IR64, MTL250) (Hoa *et al.*, 2003). Dans ces conditions, une accumulation de carotène de 0,1 à 0,9 $\mu\text{g/g}$ dans les grains T1 et de 0,8 $\mu\text{g/g}$ en moyenne dans les grains T2 des lignées de riz doré *indica* a été obtenue. En parallèle, la société Syngenta parvenait à atteindre une accumulation de 6 $\mu\text{g/g}$ dans les grains des événements de transformation débarrassés de marqueurs de sélection de riz *japonica* tropical en utilisant le promoteur de glutéline pour contrôler l'expression

du gène *crt1* spécifiquement dans l'albumen. En 2005, la société Syngenta publiait ainsi l'obtention d'un riz doré de seconde génération accumulant 31 $\mu\text{g/g}$ de β -carotène, représentant 84 % des caroténoïdes totaux. Ce saut quantitatif a été obtenu par une évaluation systématique dans l'albumen de l'expression d'ADNc de différentes espèces, orthologues du gène *psy* du narcisse et notamment ceux du maïs et du riz (Paine *et al.*, 2005) (figure 3). Ce taux permet de couvrir 50 % de l'apport journalier recommandé avec une ration quotidienne de 72 g de riz doré (un rapport

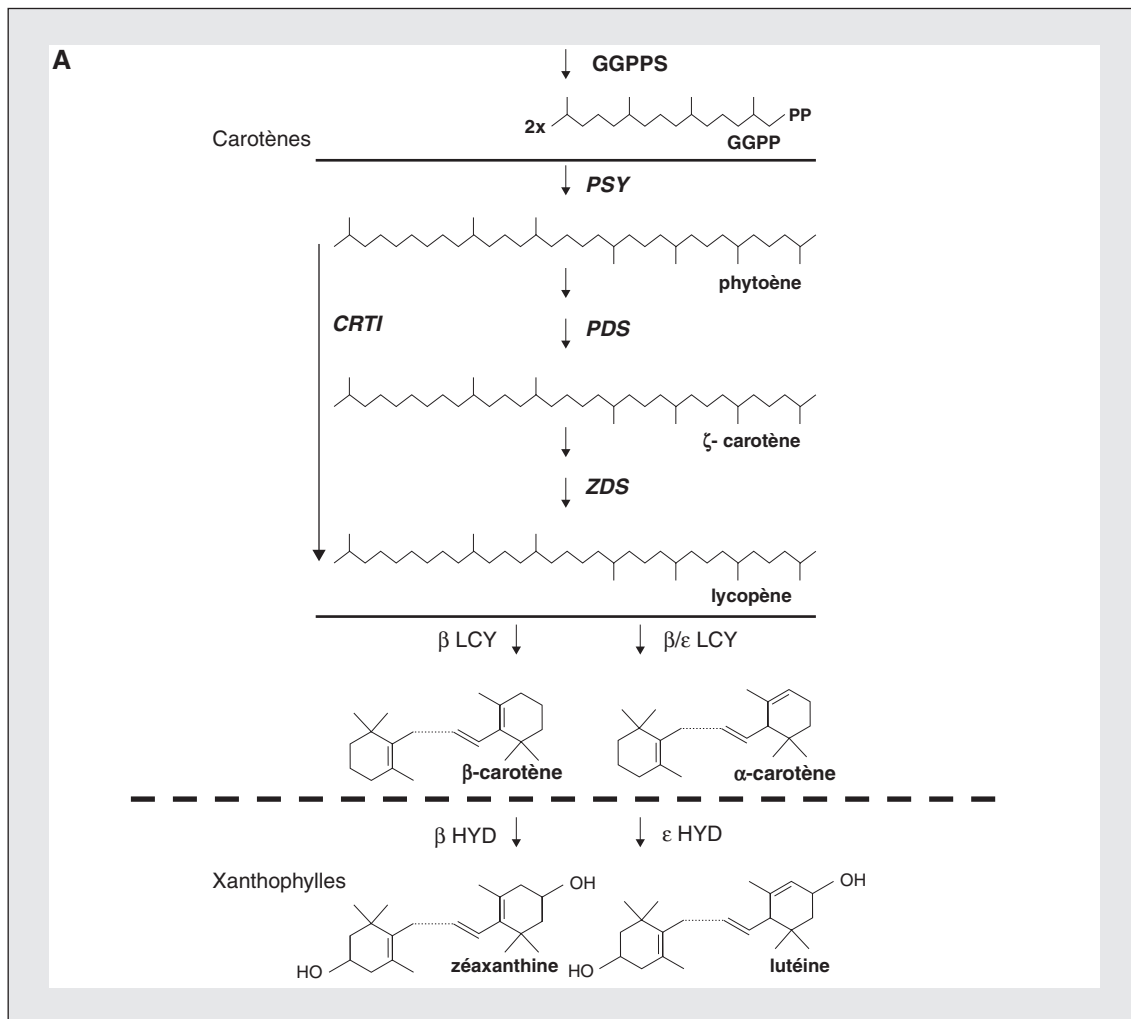


Figure 3. Modification des qualités nutritionnelles du grain : l'exemple du riz doré enrichi en β -carotène (Burkhardt *et al.*, 1997 ; Ye *et al.*, 2000 ; Hoa *et al.*, 2003 ; Paine *et al.*, 2005 ; Barry G., International Rice Research Institute (IRRI), communication personnelle).

Figure 3. Modification of grain nutritional qualities: example of β -carotene enriched golden rice (Burkhardt *et al.*, 1997 ; Ye *et al.*, 2000 ; Hoa *et al.*, 2003 ; Paine *et al.*, 2005 ; Barry G., International Rice Research Institute (IRRI), personal communication).

A) La molécule précurseur de la synthèse des caroténoïdes est le génylgeranyl diphosphate (GGPP). Les barres horizontales délimitent les étapes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes qui ont été reproduites en utilisant deux transgènes, l'un d'origine végétale et codant pour la phytoène synthase (PSY) et l'autre d'origine bactérienne et multifonctionnel codant pour la β -carotène désaturase (Crt1), qui accomplissent la fonction des deux désaturases, phytoène désaturase (PDS) et carotène désaturase (ZDS). Le relais est ensuite pris par la lycopène β -cyclase (β -LCY) endogène du riz qui s'est avérée induite en quantité suffisante pour former le β -carotène.

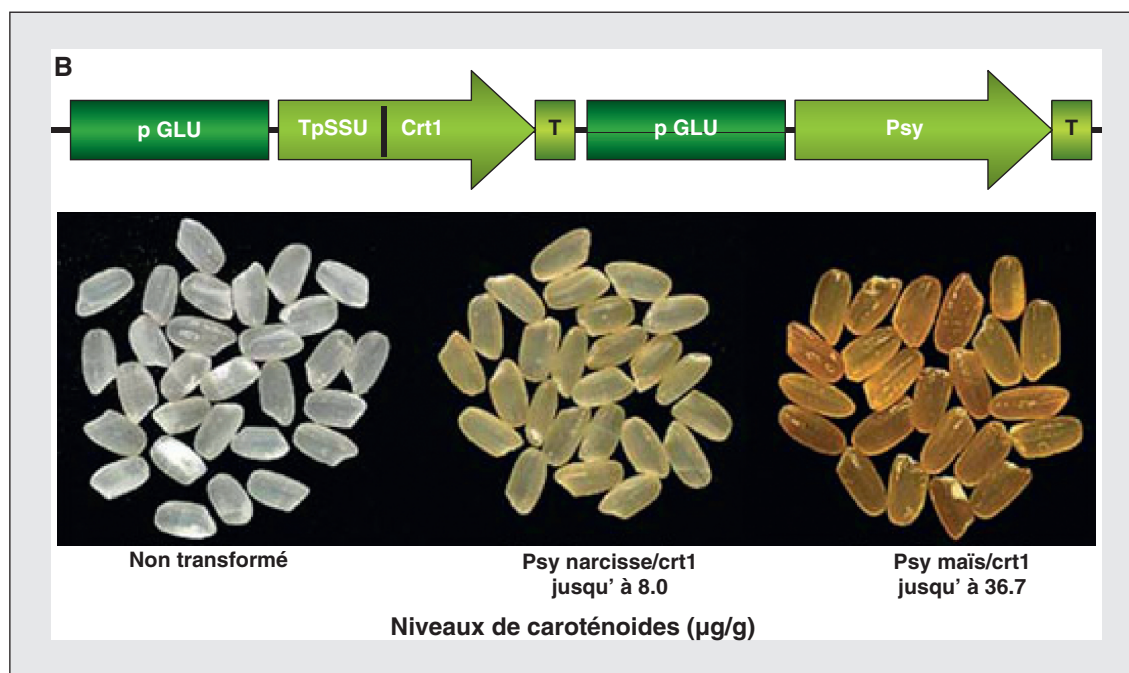


Figure 3. (suite) : B) représentation schématique du construit où le promoteur du gène de la protéine de réserve du grain de riz, la glutéline (GLU), gouverne de façon spécifique dans l'albumen du grain l'expression du gène de la β -carotène désaturase fusionnée au peptide de transit de la sucrose synthase (TpSSU) à destination chloroplastique et du gène de la PSY, dont l'action combinée conduit à la formation de lycopène, composé rouge ; **C)** l'utilisation du gène de PSY du maïs a permis un saut quantitatif dans l'accumulation du β -carotène précurseur de la vitamine A entre les riz dorés de première et seconde générations.

de bioconversion du β -carotène en vitamine A de 1:12 est utilisé). Des essais de conservation (dégradation du carotène et clivage par la caroténoïde oxygénase) et des essais nutritionnels, notamment pour déterminer la biodisponibilité (absorption) et la bioefficacité (clivage enzymatique) du carotène contenu dans les grains de riz doré, sont actuellement en cours pour aboutir à une image globale de l'apport réel à l'organisme en vitamine A (Tang *et al.*, 2009). Les transgènes de riz doré de première génération (gène *PMI* ou gène de sélection éliminé) ont été introduits par croisement dans des variétés localement adaptées notamment par l'*International Rice Research Institute* (IRRI), tandis que le même travail est en cours de réalisation avec le riz doré de seconde génération à la teneur en carotène supérieure. Sur la lancée du riz doré, de grands projets internationaux ont été lancés, notamment au travers du *Global Challenge Program* de biofortification, *Harvest Plus*, et des *Grand Challenges for Global Health* de la fondation Bill and Melinda Gates, sur les espèces végétales de grande culture du mandat des centres du Groupe consultatif pour la

recherche agronomique internationale. En combinant les approches d'évaluation de la diversité naturelle et de sélection conventionnelle pour ces caractères et des approches de transgénèse, ces projets visent à obtenir des nouvelles variétés combinant des contenus en vitamines (A, E, etc.), en acides aminés essentiels et en oligoéléments (Fe, Zn) essentiels améliorés. Les approches d'augmentation de l'apport en fer ont consisté en l'expression de gènes intervenant dans la synthèse de phytase qui inhibe l'action de l'acide phytique par hydrolyse et augmente ainsi la biodisponibilité du fer présent dans le grain (Lucca *et al.*, 2001 ; Hong *et al.*, 2004). Une autre approche a visé une expression constitutive ou spécifique de l'albumen de gènes de ferritine du soja (Goto *et al.*, 1999) et du pois (Lucca *et al.*, 2001), alliée ou non avec une surexpression des gènes de nicotianamine synthase déjà citée plus haut (Wirth *et al.*, 2009 ; Johnson *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2011). Le grain de riz a également été utilisé comme support pour y exprimer des protéines recombinantes, telles que la lactoferrine (Nandi *et al.*, 2002) ou le lysozyme (Huang *et al.*, 2002) humain

ou pour réaliser une immunothérapie par voie orale par expression de peptides épitopes d'allergènes (Okada *et al.*, 2003).

Amélioration de l'efficacité photosynthétique du riz : le riz C4

Les plantes, possédant une photosynthèse en C4 comme le maïs ou le sorgho, présentent une adaptation anatomique des feuilles et une dissociation dans l'espace des phases photochimique et non photochimique de la photosynthèse. Chez ces plantes, la pression partielle de CO_2 atteinte dans les cellules de la gaine périvasculaire est plus de 10 fois supérieure à la pression rencontrée chez les plantes C3 (2 200 ppm au lieu de 200 ppm), ce qui permet une photosynthèse active même lors de la fermeture partielle des stomates de ces plantes adaptées à une croissance sous des climats arides. Les enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPc) et pyruvate,

orthophosphate dikinase (PPDK) du maïs exprimées chez le riz, séparément ou en association, ont conduit à une amélioration de la capacité photosynthétique associée avec une meilleure conductance stomatique et une concentration interne en CO₂ plus élevée. Les données d'essai au champ ont montré une augmentation spectaculaire du rendement de 10 à 20 % et de 30 à 35 % chez des plantes de riz transgéniques suraccumulant les enzymes PEPc et PPDK du maïs respectivement (Ku *et al.*, 1999). Ces résultats encourageants n'ont cependant pas été confirmés dans une étude plus récente (Taniguchi *et al.*, 2008). Récemment, un programme ambitieux financé par la fondation Bill et Melinda Gates a réuni un réseau de laboratoires, dont l'IRRI, pour réaliser l'ingénierie d'un riz C4. Le projet vise à modifier et compartimenter la machinerie biochimique de la photosynthèse par des stratégies de sur- et sous-expression spécifique dans différents tissus de la feuille tout en recherchant une convergence de différenciation anatomique avec les plantes en C4 (augmentation du nombre de vaisseaux dans la feuille et diminution du nombre de files de cellules de Mésophylle entre les veines). La recherche des gènes impliqués dans le contrôle de ces caractères est réalisée en criblant des lignées « gain de fonction » de riz (obtenues par *activation-tagging*) et des mutants perte de fonction de sorgho (Kajala *et al.*, 2011). Le défi est important mais des avis contrastés sont émis sur la pertinence de développer un riz C4 : en effet, l'augmentation prévisible de la teneur en CO₂ de l'atmosphère pourrait rendre à terme les plantes C3 plus performantes et diminuer l'écart d'efficacité existant avec les plantes C4.

Diffusion et acceptation des innovations basées sur la transgénèse

Après avoir été parmi les premières céréales chez lesquelles des techniques efficaces de transformation génétique

ont été mises au point et utilisées avec succès pour transférer des gènes d'intérêt, le riz devrait logiquement être la prochaine plante de grande culture chez laquelle des variétés transgéniques devraient être diffusées (Chen *et al.*, 2011). Des riz transgéniques, résistants aux insectes, et dont les qualités nutritionnelles du grain sont améliorées, sont déjà prêts et sont entrés dans le long processus d'évaluation nécessaire pour une mise sur le marché. Le bénéfice potentiel pour l'environnement et la santé paraît suffisamment établi. Depuis plus de 15 ans, les cultures de coton et de maïs *Bt* ont fait la preuve de leur efficacité sur des millions d'hectares en permettant la réduction de l'utilisation de pesticides de synthèse (Lu *et al.*, 2012). Cependant, l'acceptabilité actuelle de ce type de produit par les consommateurs en Europe et au Japon a considérablement ralenti le processus pour le riz. Après avoir été pionnier du développement de ces technologies et disposant de formules hybrides de riz *Bt* efficaces et prêtes à être diffusées depuis dix ans, les autorités chinoises semblent faire marche arrière face à la montée de l'activisme dans leur pays et à une anticipation de l'impact qui pourrait résulter de la mise en culture de ces variétés sur les exportations des produits dérivés du riz. Pour cette raison, les premières diffusions pourraient être effectuées plutôt en Inde et au Bangladesh, avec notamment le riz doré enrichi en provitamine A. Ce dernier, que l'on pouvait pourtant penser *a priori* protégé par ses visées humanitaires, a également fait l'objet de virulentes attaques dès l'annonce de son obtention au début des années 2000. Il a été rapidement dénoncé comme un gadget facilement remplaçable par la diversification alimentaire et constituant de fait un fer de lance du lobby des industries agrochimiques pour imposer les OGM dans les pays en développement tout en s'achetant une bonne conscience.

Les résistances aux virus, obtenues par diverses stratégies et qui répondent à un besoin très urgent vu l'impact que peuvent avoir les maladies causées par ces pathogènes certaines années, pourraient également être utilisées comme complément aux rares sources de résistance naturelle au virus ou à son vecteur identifiées chez le riz. Cependant, les programmes de diffu-

sion des innovations restent là encore hésitants. Rappelons également le précédent arrêt de la diffusion vers l'Asie du Sud-Est, et notamment en Thaïlande, de la papaye résistante aux virus mise au point par la recherche publique aux Hawaï où les cultures sont ainsi protégées de façon très efficace par cette méthode, suite à une campagne non moins efficace d'organisations environnementales.

Application plus discutable, des riz transgéniques tolérants aux herbicides (glufosinate d'ammonium, glyphosate, sulfonyles) ont également été mis au point, notamment pour le marché nord-américain. Les sociétés obtentrices ont pour le moment renoncé à leur diffusion en raison des problèmes de séparation des filières destinées à l'exportation en Europe. Un problème est également lié au croisement possible avec la forme adventive du riz, le riz rouge, interfertile avec le riz cultivé qui pourrait conduire au développement de formes résistantes (Messegueur *et al.*, 2004). Paradoxalement, la société BASF a développé par mutation induite dans le gène de l'acétyl-lactate synthase, cible des herbicides de la classe de sulfonyles, des riz tolérants à ces herbicides qui ont été commercialisés en Europe sans aucune protestation, sous la technologie Clearfield. Ces riz non-OGM posent pourtant exactement les mêmes problèmes que les riz tolérants obtenus par transgénèse (flux de gènes, apparition de résistances chez les mauvaises herbes, etc.). La lutte contre les mauvaises herbes reste néanmoins un des problèmes dominants de la riziculture pluviale conduite notamment sur le continent africain.

Des riz produisant des molécules pharmaceutiques comme la lactoferrine, puissant antiseptique du lait maternel, ont également été en phase de test. La farine de ces riz pourrait aider à lutter contre la dysenterie du nourrisson non allaité au lait maternel, notamment dans les pays en développement. Les essais au champ en Californie ont cependant dû être suspendus du fait des craintes soulevées par un possible flux de gènes vers des cultures conventionnelles.

La tolérance aux contraintes abiotiques pourrait constituer l'objectif de sélection pour lequel le recours à

l'ingénierie génétique serait le plus acceptable pour les consommateurs européens. Nous avons cependant vu que la plupart de ces innovations n'en sont encore qu'au stade d'évaluation au champ, où elles sont confrontées à de multiples scénarios de stress afin de valider leur efficacité. Toutefois, même si ces stress peuvent varier dans leur combinaison, leur sévérité ou le stade de développement de la culture où ils surviennent, ils restent connus, et le contournement des tolérances ne peut pas résulter, comme dans le cas des interactions biotiques, d'une coévolution imprévisible du partenaire.

En conclusion, nous avons vu que les innovations issues de l'ingénierie génétique peuvent appuyer la sélection conventionnelle assistée par la génomique chez le riz, notamment pour des caractères où l'objectif fixé pourra être atteint plus vite ou uniquement par cette technologie. Les méthodes de transgénèse, quant à elles, évoluent vers une précision accrue des changements apportés au génome qui pourront rendre à terme les modifications obtenues plus proches de celles de la recombinaison naturelle ou de la mutagenèse. ■

Remerciements

La fondation Agropolis, la Commission européenne et l'Agence nationale de la recherche (ANR) sont vivement remerciées pour leur soutien aux activités de l'équipe. Les auteurs remercient Martine Bès, Nadège Lanau, Florence Artus, Aurore Vernet, Murielle Portefaix, Christian Chaine, Rémy Michel et Eve Lorenzini pour leur participation aux projets de recherche de l'équipe. Ils remercient Nourollah Ahmadi et Brigitte Courtois pour leur relecture du manuscrit.

Références

- Asano T, Hakata M, Nakamura H, Aoki N, Komatsu S, Ichikawa H, *et al.*, 2011. Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 75 : 179-91.
- Babu RC, Zhang JX, Blum A, Ho THD, Wu R, Nguyen HT, 2004. HVA1, a *LEA* gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* 166 : 855-62.
- Bajaj S, Mohanty A, 2005. Recent advances in rice biotechnology—towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 3 : 275-307.
- Ben Saad R, Fabre D, Mieulet D, Meynard D, Dingkuhn M, Al-Doss A, *et al.*, 2012. Expression of the *Aeluropus littoralis* *ALSAP* gene in rice confers broad tolerance to abiotic stresses through maintenance of photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* 35 : 626-43.
- Breitler JC, Marfa V, Royer M, Meynard D, Vassal JM, Vercambre B, *et al.*, 2000. Expression of a *Bacillus thuringiensis* cry1B synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Reports* 19 : 1195-202. doi: 10.1007/s002990000247.
- Breitler JC, Cordero MJ, Royer M, Meynard D, San Segundo B, Guiderdoni E, 2001. The -689/+197 region of the maize protease inhibitor gene directs high level, wound-inducible expression of the *cry1B* gene which protects transgenic rice plants from stem borer attack. *Molecular Breeding* 7 : 259-74.
- Breitler JC, Vassal JM, Catala MD, Meynard D, Marfa V, Mele E, *et al.*, 2004. *Bt* rice harbouring *cry* genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal* 2 : 417-30.
- Burkhardt PK, Beyer P, Wunn J, Kloti A, Armstrong GA, Schledz M, *et al.*, 1997. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant Journal* 11 : 1071-8. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11051071.
- Campo S, Peris-Peris C, Montesinos L, Penas G, Messeguer J, San Segundo B, 2012. Expression of the maize *ZmGF14-6* gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection. *Journal of Experimental Botany* 63 : 983-99. doi: 10.1093/jxb/err328.
- Chen M, Shelton A, Ye GY, 2011. Insect-resistant genetically modified rice in China: from research to commercialization. *Annual Review of Entomology* 56 : 81-101. doi: 10.1146/annurev-ento-120709-144810.
- Chen Y, Tian J, Shen Z, Peng Y, Hu C, Guo Y, *et al.*, 2010. Transgenic rice plants expressing a fused protein of Cry1Ab/Vip3H has resistance to rice stem borers under laboratory and field conditions. *Journal of Economic Entomology* 103 : 1444-53.
- Cordero MJ, Raventos D, San Segundo B, 1994. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant Journal* 6 : 141-50. doi: 10.1046/j.1365-313X.1994.6020141.x.
- Dai S, Wei X, Alfonso AA, Pei L, Duque UG, Zhang Z, *et al.*, 2008. Transgenic rice plants that overexpress transcription factors RF2a and RF2b are tolerant to rice tungro virus replication and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 : 21012-6. doi: 10.1073/pnas.0810303105.
- Duan X, Li X, Xue Q, Abo-Ei-Saad M, Xu D, Wu R, 1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology* 14 : 494-8. doi: 10.1038/nbt0496-494.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, *et al.*, 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal* 33 : 751-63. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01661.x.
- Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyojuka J, Shimamoto K, 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnology* 11 : 1151-5. doi: 10.1038/nbt1093-1151.
- Gao T, Wu Y, Zhang Y, Liu L, Ning Y, Wang D, *et al.*, 2011. *OsSDIR1* overexpression greatly improves drought tolerance in transgenic rice. *Plant Molecular Biology* 76 : 145-56. doi: 10.1007/s11103-011-9775-z.
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Do Choi Y, Kochian LV, *et al.*, 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 : 15898-903. doi: 10.1073/pnas.252637799.
- Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F, 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* 17 : 282-6. doi: 10.1038/7029.
- High SM, Cohen MB, Shu QY, Altosaar I, 2004. Achieving successful deployment of *Bt* rice. *Trends in Plant Science* 9 : 286-92. doi: doi.org/10.1016/j.tplants.2004.04.002.
- Hoa TTC, Al-Babili S, Schaub P, Potrykus I, Beyer P, 2003. Golden *indica* and *japonica* rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiology* 133 : 161-9. doi: 10.1104/pp.103.023457.
- Hong CY, Cheng KJ, Tseng TH, Wang CS, Liu LF, Yu SM, 2004. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Research* 13 : 29-39.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, *et al.*, 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 : 12987-92. doi: 10.1073/pnas.0604882103.
- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L, 2008. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 67 : 169-81. doi: 10.1007/s11103-008-9310-z.
- Huang JK, Hu RF, Rozelle S, Pray C, 2005. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity and health effects in China. *Science* 308 : 688-90. doi: 10.1126/science.1108972.
- Huang JM, Nandi S, Wu LY, Yalda D, Bartley G, Rodriguez R, *et al.*, 2002. Expression of natural antimicrobial human lysozyme in rice grains. *Molecular Breeding* 10 : 83-94. doi: 10.1023/A:1020355511981.
- Huang XY, Chao DY, Gao JP, Zhu MZ, Shi M, Lin HX, 2009. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes & Development* 23 : 1805-17. doi: 10.1101/gad.1812409.
- Huet H, Mahendra S, Wang J, Sivamani E, Ong CA, Chen L, *et al.*, 1999. Near immunity to rice tungro spherical virus achieved in rice by a replicase-mediated resistance strategy. *Phytopathology* 89 : 1022-7.

- Hur J, Jung KH, Lee CH, An GH, 2004. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science* 167 : 417-26. doi: doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.009.
- Irie K, Hosoyama H, Takeuchi T, Iwabuchi K, Watanabe H, Abe M, *et al.*, 1996. Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Molecular Biology* 30 : 149-57.
- Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, *et al.*, 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology* 131 : 516-24.
- Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, Do Choi Y, *et al.*, 2010. Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology* 153 : 985-97.
- Johnson AAT, Kyriacou B, Callahan DL, Carruthers L, Stangoulis J, Lombi E, *et al.*, 2011. Constitutive overexpression of the *OsNAS* gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. *PLoS ONE* 6 : e24476.
- Kajala K, Covshoff S, Karki S, Woodfield H, Tolley BJ, Dionora MJA, *et al.*, 2011. Strategies for engineering a two-celled C4 photosynthetic pathway into rice. *Journal of Experimental Botany* 62 : 3001-10. doi: 10.1093/jxb/err022.
- Kanneganti V, Gupta A, 2008. Overexpression of *OsiSAP8*, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. *Plant Molecular Biology* 66 : 445-62.
- Karaba A, Dixit X, Greco R, Aharoni A, Trijatmiko KR, Marsch-Martinez N, *et al.*, 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 : 15270-5. doi: 10.1073/pnas.0707294104.
- Kathuria H, Giri J, Nataraja KN, Murata N, Udayakumar M, Tyagi AK, 2009. Glycinebetaine-induced water-stress tolerance in *codA*-expressing transgenic *indica* rice is associated with up-regulation of several stress responsive genes. *Plant Biotechnology Journal* 7 : 512-26.
- Katsuhara M, Koshio K, Shibusaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, 2003. Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology* 44 : 1378-83.
- Kobayashi T, Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S, *et al.*, 2007. The transcription factor *IDEF1* regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 : 19150-5. doi: 10.1073/pnas.0707010104.
- Ku MSB, Agarie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, *et al.*, 1999. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotechnology* 17 : 76-80.
- Kurai T, Wakayama M, Abiko T, Yanagisawa S, Aoki N, Ohsugi R, 2011. Introduction of the *ZmDof1* gene into rice enhances carbon and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions. *Plant Biotechnology Journal* 9 : 826-37.
- Lee SI, Lee SH, Koo JC, Chun HJ, Lim CO, Mun JH, *et al.*, 1999. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown plant hopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in transgenic rice. *Molecular Breeding* 5 : 1-9.
- Lee SI, Persson DP, Hansen TH, Husted S, Schjoerring JK, Kim YS, *et al.*, 2011. Bio-available zinc in rice seeds is increased by activation tagging of nicotianamine synthase. *Plant Biotechnology Journal* 9 : 865-73.
- Lentini Z, Lozano I, Tabares E, Fory L, Dominguez J, Cuervo M, *et al.*, 2003. Expression and inheritance of hypersensitive resistance to rice hoja blanca virus mediated by the viral nucleocapsid protein gene in transgenic rice. *Theoretical and Applied Genetics* 106 : 1018-26.
- Li W, Zhong S, Li G, Li Q, Mao B, Deng Y, *et al.*, 2011. Rice RING protein OsBBI1 with E3 ligase activity confers broad-spectrum resistance against *Magnaporthe oryzae* by modifying the cell wall defence. *Cell Research* 21 : 835-48.
- Liu H, Zhang H, Yang Y, Li G, Yang Y, Wang XE, *et al.*, 2008. Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene *OsBIRF1* on regulation of growth and defense responses against abiotic and biotic stresses. *Plant Molecular Biology* 68 : 17-30. doi: 10.1007/s11103-008-9349-x.
- Lu Y, Wu K, Jiang Y, Guo Y, Desneux N, 2012. Widespread adoption of *Bt* cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature* 487 : 362-5.
- Lucca P, Hurrell R, Potrykus I, 2001. Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 : 828-34.
- Ma Q, Dai X, Xu Y, Guo J, Liu Y, Chen N, *et al.*, 2009. Enhanced tolerance to chilling stress in *OsMYB3R-2* transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes. *Plant Physiology* 150 : 244-56. doi: 10.1104/pp.108.133454.
- Messeguer J, Marfa V, Catala MM, Guiderdoni E, Mele E, 2004. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. *Molecular Breeding* 13 : 103-12. doi: 10.1023/B:MOLB.0000012285.39859.9d.
- Mochizuki A, Nishizawa Y, Onodera H, Tabei Y, Toki S, Habu Y, *et al.*, 1999. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93 : 173-8. doi: 10.1046/j.1570-7458.1999.00576.x.
- Murakami T, Matsuba S, Funatsuki H, Kawaguchi K, Saruyama H, Tanida M, *et al.*, 2004. Over-expression of a small heat shock protein, sHSP17.7, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants. *Molecular Breeding* 13 : 165-75.
- Nandi S, Suzuki YA, Huang JM, Yalda D, Pham P, Wu LY, *et al.*, 2002. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science* 163 : 713-22.
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, *et al.*, 2005. *Arabidopsis* *CBF3/DREB1A* and *ABF3* in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology* 138 : 341-51. doi: 10.1104/pp.104.059147.
- Oh SJ, Kwon CW, Choi DW, Song SI, Kim JK, 2007. Expression of barley *HvCBF4* enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5 : 646-56. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00272.x.
- Oh SJ, Kim YS, Kwon CW, Park HK, Jeong JS, Kim JK, 2009. Overexpression of the transcription factor *AP37* in rice improves grain yield under drought conditions. *Plant Physiology* 150 : 1368-79. doi: 10.1104/pp.109.137554.
- Okada A, Okada T, Ide T, Itoh M, Tanaka K, Takaiwa F, *et al.*, 2003. Accumulation of Japanese cedar pollen allergen, Cry j 1, in the protein body I of transgenic rice seeds using the promoter and signal sequence of glutelin *GluB-1* gene. *Molecular Breeding* 12 : 61-70. doi: 10.1023/A:1025491608267.
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, *et al.*, 2005. Improving the nutritional value of golden rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23 : 482-7.
- Pinto YM, Kok RA, Baulcombe DC, 1999. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nature Biotechnology* 17 : 702-7. doi: 10.1038/10917.
- Quan R, Hu S, Zhang Z, Zhang H, Zhang Z, Huang R, 2010. Overexpression of an ERF transcription factor *TSRF1* improves rice drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal* 8 : 476-88. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00492.x.
- Quilis J, Meynard D, Vila L, Avilés FX, Guiderdoni E, San Segundo B, 2007. A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5 : 537-53.
- Quilis J, Penas G, Messeguer J, Brugidou C, Segundo BS, 2008. The *Arabidopsis* AtNPR1 inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 : 1215-31. doi: 10.1094/mpmi-21-9-1215.
- Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K, Izui K, 2000. Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant Journal* 23 : 319-27.
- Sakamoto A, Murata N, 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environment* 25 : 163-71.
- Shrawat AK, Carroll RT, DePauw M, Taylor GJ, Good AG, 2008. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotechnology Journal* 6 : 722-32.
- Shu QU, Ye GY, Cui HR, Cheng XY, Xiang YB, Wu DX, *et al.*, 2000. Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding* 6 : 433-9.
- Su J, Wu R, 2004. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Science* 166 : 941-8.
- Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S, 2001. Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnology* 19 : 466-9. doi: 10.1038/88143.
- Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, *et al.*, 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor *OsNAC5*

- regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 284 : 173-83. doi: 10.1007/s00438-010-0557-0.
- Tang G, Qin J, Dolnikowski GG, Russell RM, Grusak MA, 2009. Golden rice is an effective source of vitamin A. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 : 1776-83. doi: 10.3945/ajcn.2008.27119.
- Taniguchi Y, Ohkawa H, Masumoto C, Fukuda T, Tamai T, Lee K, *et al.*, 2008. Overproduction of C4 photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C4-like photosynthetic pathway into rice. *Journal of Experimental Botany* 59 : 1799-809. doi: 10.1093/jxb/ern016.
- Tu JM, Zhang GA, Datta K, Xu CG, He YQ, Zhang QF, *et al.*, 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Nature Biotechnology* 18 : 1101-4.
- Tyagi AK, Mohanty A, 2000. Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Science* 158 : 1-18.
- Vila L, Quilis J, Meynard D, Breittler JC, Marfa V, Murillo I, *et al.*, 2005. Expression of the maize proteinase inhibitor (*mpi*) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology Journal* 3 : 187-202. doi: 10.1111/j.1467-7652.2004.00117.x.
- Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C, 2008. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology* 67 : 589-602. doi: 10.1007/s11103-008-9340-6.
- Wirth J, Poletti S, Aeschlimann B, Yakandawala N, Drosse B, Osorio S, *et al.*, 2009. Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin. *Plant Biotechnology Journal* 7 : 631-44. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00430.x.
- Wunn J, Kloti A, Burkhardt PK, Biswas GC, Launis K, Iglesias VA, *et al.*, 1996. Transgenic *indica* rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Nature Biotechnology* 14 : 171-6. doi: 10.1038/nbt0296-171.
- Xiang Y, Tang N, Du H, Ye H, Xiong L, 2008. Characterization of *OsbZIP23* as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiology* 148 : 1938-52. doi: 10.1104/pp.108.128199.
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L, 2007. Overexpression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 115 : 35-46. doi: 10.1007/s00122-007-0538-9.
- Xiong LZ, Yang YN, 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15 : 745-59. doi: 10.1105/tpc008714.
- Xu D, Xue Q, Mc Elroy D, Mawal Y, Hilder VA, Wu R, 1996a. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, *CpTi*, in transgenic rice confers resistance to two major rice pests. *Molecular Breeding* 2 : 167-73. doi: 10.1007/BF00441431.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R, 1996b. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110 : 249-57.
- Yarasi B, Sadumpati V, Immanni C, Vudem D, Khareedu V, 2008. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) exhibits high-level resistance against major sap-sucking pests. *BMC Plant Biology* 8 : 102. doi: 10.1186/1471-2229-8-102.
- Ye GY, Shu QY, Yao HW, Cui HR, Cheng XY, Hu C, *et al.*, 2001. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *Journal of Economic Entomology* 94 : 271-6. doi: 10.1603/0022-0493-94.1.271.
- Ye XD, Al-Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, *et al.*, 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287 : 303-5.
- Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L, He G, 2011. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE* 6 : e20504. doi: 10.1371/journal.pone.0020504.