

# Amélioration conjointe de l'efficacité d'absorption de l'azote et de la teneur en protéines chez le blé tendre

Jacques LE GOUIS\*<sup>1</sup>, Maryse BRANCOURT<sup>1</sup>, Daniel DORVILLEZ<sup>1</sup>, Marie-Chantal MANSARD<sup>1</sup>, Céline HERBAIN<sup>1</sup>, Jean-Marie MACHET<sup>2</sup>, Bertrand HIREL<sup>3</sup>, Marie-Hélène JEUFFROY<sup>4</sup>, Olivier GARDET<sup>5</sup>, Stéphane GILLES<sup>5</sup>, Laurent GUERREIRO<sup>6</sup>, Philippe GATE<sup>7</sup>, Régis DOUCET<sup>8</sup>, Michel BONNEFOY<sup>8</sup>, Volker LEIN<sup>9</sup>, Michel MADRE<sup>10</sup>, Pascal GIRAUDEAU<sup>10</sup>, Philippe MOMONT<sup>11</sup>, Stephen SUNDERWIRTH<sup>11</sup>, Jean-Michel MOREAU<sup>12</sup>, Jean-Michel DELHAYE<sup>13</sup>, Philippe LEREBOUR<sup>14</sup>

\* **Coordinateur** : Jacques LE GOUIS, jlegouis@clermont.inra.fr, Tél. : 04 73 62 43 11

- 1 - INRA USTL UMR 1281 Stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés Mons-Péronne - Domaine de Brunehaut, BP 50136 Estrées-Mons, 80203 Péronne
- 2 - INRA Unité d'Agronomie Laon-Reims-Mons - rue Fernand Christ, 02007 LAON Cedex
- 3 - INRA Unité de Nutrition azotée des plantes, R.D. 10 - 78026 Versailles Cedex
- 4 - UMR Agronomie INRA-AgroParisTech - 78850 Thiverval-Grignon
- 5 - UMEFV du Moulon - Expérimentation et Finition des Variétés, 91190 Gif sur Yvette
- 6 - ARVALIS - Institut du végétal - Direction scientifique, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75116 Paris
- 7 - ARVALIS - Institut du végétal - Domaine INRA-GEVES, La Minière, 78280 Guyancourt
- 8 - ARVALIS - Institut du végétal - 45 voie romaine, 41240 Ouzouer le marché
- 9 - Saaten-Union Recherche - 163 avenue de Flandre, 60190 Estrées-Saint-Denis
- 10 - SECOBRA Recherches - Centre de Bois Henry, 78580 Maule
- 11 - Momont - 154 route nationale, 28150 Allonnes
- 12 - GAE Recherche - 41 rue de rivière, 91720 Maise
- 13 - Lemaire-Deffontaines - 108 rue du Rossignol, 59310 Auchy-lez-Orchies
- 14 - UNISIGMA - 2 rue Petit-Sorri, 60480 Froissy

Le projet a pour objectif le développement de connaissances et d'outils pour la sélection de blés tendres capables de valoriser les milieux à faible disponibilité en azote (N). Le développement de telles variétés est nécessaire, notamment dans le cadre d'itinéraires techniques visant un meilleur respect de l'environnement et une baisse du coût de production, tout en assurant le maintien d'une qualité du grain adaptée aux différents débouchés. Les variables d'étude concernent principalement l'efficacité d'absorption de l'azote et la teneur en protéines du grain en situation de fertilisation azotée sous-optimale.

Le premier volet du projet comprend la caractérisation de la réponse de variétés de blé à une contrainte azotée à l'aide de mesures écophysiologicals et à l'aide du modèle Azodyn (Jeuffroy et Recous, 1999), un modèle dynamique de fonctionnement de la culture. Il permet de prédire la biomasse, la teneur en azote de la culture, ainsi que l'élaboration du rendement et de la teneur en protéines des grains en fonction des caractéristiques pédo-climatiques de la parcelle.

Le deuxième volet concerne la mesure dans la plante de l'activité des principales enzymes du métabolisme azoté dont on sait qu'elles sont impliquées dans l'absorption et la remobilisation de l'azote. Des corrélations seront effectuées avec les données agronomiques pour expliquer au niveau physiologique le comportement des plantes.

Le troisième volet vise à vérifier l'hypothèse que des blés valorisant bien l'azote dans des conditions de disponibilité limitante peuvent contribuer à limiter les reliquats en azote dans le sol au cours du temps et donc limiter les risques de pollution par les nitrates.

## 1. Protocole expérimental

### ► Expérimentations au champ

#### Matériel végétal

Trente variétés ont été choisies, soit parce qu'elles ont un comportement spécifique vis-à-vis de l'azote, en particulier en ce qui concerne leur teneur en protéines, soit parce qu'elles sont ou seront parentes de populations de lignées

recombinantes qui peuvent permettre de développer par la suite des études de génétique. Pour la plupart d'entre elles, ce sont des variétés récentes (Tableau 1), adaptées aux attentes de l'agriculteur et du secteur agro-alimentaire. Elles ont été choisies pour couvrir une large gamme de précocité (note de 4.5 à 8 pour la précocité à épiaison) afin d'évaluer l'impact du stress azoté selon le rythme de développement. Les variétés Bastide, Taldor et Tapidor n'étaient pas présentes dans certains lieux en 2004 et elles n'ont pas été prises en compte dans un certain nombre d'analyses.

Variété		Inscription	Obtenteur ou représentant
Apache	Apa	1998	Nickerson
Arche	Arc	1989	Nickerson
Aztec	Azt	1994	Nickerson
Bastide	Bas	2002	Secobra
Caphorn	Cap	2000	Desprez
Cézanne	Cez	1998	Nickerson
CF 99102	Cf9	-	INRA
Charger	Cha	1997	Desprez
Courtôt	Cou	1974	Agri-Obtentions
Equilibre	Equ	2002	Lemaire
Esperia	Esp	ce (2002)	Momont
Eurêka	Eur	1991	Agri-Obtentions
Farandole	Far	ce (1999)	Agri-Obtentions
Grisby	Gri	2001	Saaten Union
Isengrain	Ise	1997	Desprez
Isidor	Isi	2002	Unisigma
Nirvana	Nir	2001	Desprez
Ornicar	Orn	1998	Benoist
Orvantis	Orv	1999	Benoist
Parador	Par	2000	Secobra
Pernel	Per	1983	Agri-Obtentions
Québon	Que	2004	Saaten Union
Récital	Rec	1986	Benoist
Renan	Ren	1989	Agri-Obtentions
Ritmo	Rit	1990	Cebeco N.L.
Soissons	Soi	1988	Desprez
Taldor	Tal	1998	GAE
Tapidor	Tap	2001	GAE
Tilburi	Til	1994	RAGT
Vivant	Viv	1991	Momont

Tableau 1: Liste des 30 géotypes expérimentés dans le cadre du projet; la plupart sont des variétés inscrites au Catalogue officiel (ce = catalogue européen).

### Traitements

Trois principaux traitements expérimentaux ont été choisis afin (1) de couvrir une gamme relativement large de nutrition azotée et (2) d'estimer les paramètres du modèle Azodyn pour l'ensemble des variétés testées :

- traitement "Potentiel" : pour estimer le rendement potentiel de la variété,
- traitement "faible densité" : pour permettre l'estimation du Poids de Mille Grains (PMG) maximum de la variété en créant *a priori* des conditions limitant le nombre de grains par m<sup>2</sup> mais pas le PMG,
- traitement "N limitant" : pour estimer la réaction de la variété à une carence en azote en choisissant une carence marquée.

### Dispositif expérimental

Sur deux années (2003-04 et 2004-05), sept lieux d'essais ont été choisis afin de tester les variétés dans différentes conditions pédo-climatiques : Allonnes (28), Auchy (59), Estrées-Mons (80), Estrées-Saint-Denis (60), Le Moulon (91), Maise (91) et Ouzouer (41). Au total, les variétés ont été expérimentées dans 27 environnements (combinaisons lieu x année x traitement). Chaque essai a été conduit selon un dispositif en blocs complets avec deux ou trois répétitions.

### Mesures

Les principales mesures ont concerné :

- sur tous les sites, les quantités d'N minéral dans le sol, par horizon de 30 cm, sur la variété Soissons à 4 dates : semis, sortie hiver, floraison et maturité. A Mons, les reliquats à la floraison et à la maturité ont été réalisés sur 6 variétés : Apache, Arche, Charger, Récital, Ritmo et Soissons,
- sur tous les sites et tous les génotypes, la date d'épiaison, le rendement, le PMG et la teneur en protéines du grain par infra-analyseur (NIRS 6500, Foss NIRSystems, USA),
- à l'INRA de Mons et du Moulon et sur tous les génotypes, la date de floraison, la matière sèche et la teneur en N des parties aériennes à la floraison et à la maturité,
- à l'INRA de Mons et sur tous les génotypes, un échantillon aléatoire de 20 feuilles étendards a été prélevé à floraison + 14 jours et floraison + 28 jours sur le traitement "potentiel". Ces feuilles ont été congelées immédiatement dans l'azote liquide pour permettre les mesures de teneurs en protéines, activité de la glutamine synthétase, activité de la glutamate déshydrogénase et activités potentielle et réelle de la nitrate réductase.

## 2. Résultats

### ► Description de la variabilité génétique pour la réponse à une carence en azote

#### Objectif

L'objectif a été de décrire la variabilité des génotypes pour le rendement et la teneur en protéines en réponse à une carence en azote. Les analyses ont été conduites pour les 27 milieux expérimentés en 2004 et 2005 et sur 27 variétés présentes dans l'ensemble des milieux. Les analyses ont été basées sur :

- la régression conjointe, qui est la régression du rendement d'un génotype en fonction du rendement du milieu (estimé par la moyenne des rendements des variétés testées dans ce milieu),

- la relation entre le rendement obtenu à faible niveau d'azote et le rendement obtenu à fort niveau d'azote et les écarts à cette relation,
- la relation entre la teneur en protéines et le rendement et les écarts à cette relation (appelés GPD pour Grain Protein Deviation).

### Variabilité génétique

La régression conjointe permet de décrire de façon satisfaisante le comportement des variétés au vu des coefficients de détermination qui varient de 0.97 pour Quebon à 0.69 pour Récital. Les deux paramètres permettant de décrire les variétés sont ensuite le rendement moyen de la variété (ici selon les faibles niveaux d'azote) et la pente de la droite de régression. La pente indique la réponse de la variété à la fertilité du milieu et, dans notre cas où les milieux sont fortement contrastés pour le niveau d'azote, on peut estimer que cela équivaut à la réponse à l'offre en azote. Lorsque la pente est supérieure à 1, la variété répond très fortement à une variation de niveau d'azote. Lorsqu'elle est inférieure à 1, elle est beaucoup plus stable. Il existe, dans l'échantillon de variétés, une grande gamme de variations pour les deux paramètres de la régression conjointe. Des variétés comme Isengrain ou Arche présentent à la fois des rendements intéressants à faible niveau d'azote et une relative stabilité avec des pentes proches de 1. Des variétés comme Grisby et Isidor sont beaucoup plus réactives au milieu.

Il existe aussi une variabilité entre les génotypes en ce qui concerne la deuxième relation étudiée, celle reliant le rendement en conditions limitantes en azote au rendement en conditions potentielles. A partir de ces données, nous avons calculé un indice caractérisant la réponse à l'azote limitant : pour chaque variété, nous avons déterminé l'écart à la régression entre les moyennes obtenues à chacun des deux niveaux d'azote. Lorsque l'écart est positif, la variété est considérée comme tolérante, tandis que la variété est considérée comme sensible, lorsque l'écart est négatif. Par exemple, Ornicar, Parador et Renan sont considérées comme tolérantes, tandis que Grisby et Soissons sont considérées comme sensibles.

La troisième relation étudiée est celle reliant la teneur en protéines au rendement et permettant l'estimation du GPD (écart à la relation rendement-teneur en protéines). La teneur en protéines et le rendement sont, de façon générale, corrélés négativement. Le coefficient de corrélation est ainsi de  $r = -0.64$  pour le niveau potentiel et de  $r = -0.69$  pour le niveau N limitant. Il est toutefois possible d'identifier des variétés qui s'écartent de la relation négative. Les GPD obtenus pour les deux niveaux de fertilisation azotée sont assez fortement corrélés ( $r=0.75$ ) indiquant une bonne conservation des classements entre les deux niveaux de fertilisation azotée. Des variétés comme Parador et Arche montre un écart négatif et Quebon et Renan un écart positif quel que soit le niveau d'azote. Pour d'autres variétés, telles que Ornicar, Courtôt, Vivant ou Eureka, les classements peuvent varier, mais les écarts sont faibles entre les deux conditions (inférieurs à 0.5).

Dans une dernière étape, nous avons comparé les deux types d'écarts analysés précédemment, c'est-à-dire les GPD avec les écarts de réponse à l'azote limitant. Ces deux

variables étant faiblement corrélées (0.21), il existe une grande variabilité entre les génotypes (Figure 1).

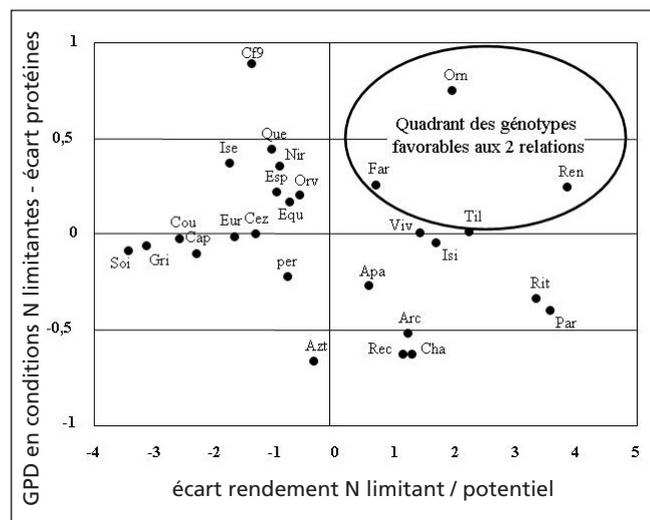


Figure 1 : Comparaison de l'écart à la relation rendement / teneur en protéines (GPD) et de la réponse à l'azote limitant mesuré par l'écart à la relation rendement N limitant / rendement conditions potentielles (les abréviations des noms des variétés sont données dans le Tableau 1).

### ► Paramétrage variétal du modèle Azodyn

#### Objectifs

Les trois objectifs sont :

- proposer une méthode de paramétrisation et d'utilisation du modèle Azodyn adaptée à une grande série variétale. L'identification des paramètres génotypiques importants a déjà fait l'objet d'un travail antérieur (Barbottin, 2004),
- évaluer la capacité prédictive du modèle pour le rendement en grain à faible et à fort niveau d'azote,
- identifier les paramètres génotypiques du modèle qui ont une influence sur la tolérance à une carence en azote.

#### Paramétrage génotypique du modèle

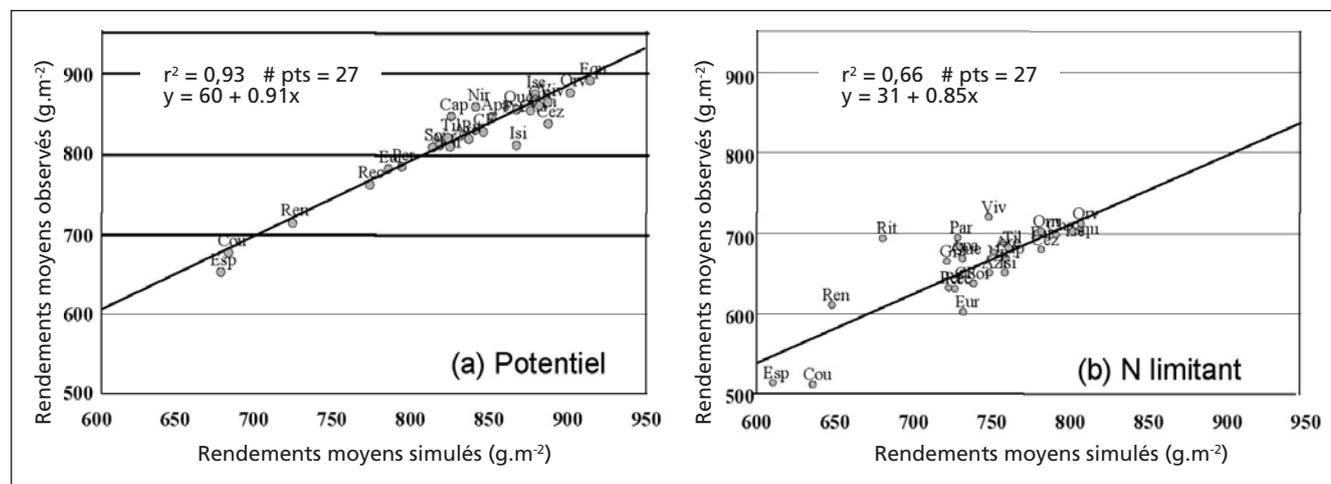
Pour générer des variables de sortie (rendement en grain, teneur en protéines), le modèle utilise des variables d'entrée (date de floraison, date du stade épi "1 cm") et des paramètres. Les trois paramètres génotypiques nécessaires à la prise en compte de l'effet variété par le modèle (Barbottin, 2004) sont le poids de mille grains maximal (PMG<sub>max</sub>), le rendement maximal (RDT<sub>max</sub>) et le

nombre de grains potentiel. Ce dernier est défini par le ratio du nombre de grains sur le rayonnement intercepté par le couvert (NG). Ces trois paramètres ne sont connus avec précision au début de l'étude que pour quelques variétés témoins.

Trois méthodes statistiques ont été utilisées pour déterminer le RDT<sub>max</sub> et PMG<sub>max</sub> (Herbain, 2006) : (1) le choix de la valeur maximum observée sur le réseau d'essais, (2) le calcul de différents quantiles, et (3) une méthode de ré-échantillonnage (bootstrap). Trois méthodes ont aussi été retenues pour la détermination de αNG, en ne considérant à chaque fois que les situations potentielles, c'est à dire permettant d'obtenir le nombre de grains maximum pour chaque variété : (1) rapport entre le nombre de grains.m<sup>-2</sup> de la variété étudiée sur celui de la variété Soissons, ce même rapport (2) pondéré par la somme de rayonnement incident entre le stade épi à 1cm et l'épiaison et (3) pondéré par la somme en degré.jour entre le stade épi à 1cm et l'épiaison.

Dix-huit paramétrages ont été testés, chacun étant une combinaison des différentes méthodes d'estimation du RDT<sub>max</sub>, PMG<sub>max</sub> et αNG. Le paramétrage qui a été retenu est celui conduisant à la plus faible erreur moyenne de prédiction (RMSEP ou Root Mean Square Error of Prediction). Cette erreur est obtenue en calculant la racine carrée de la somme des carrés des différences (valeur observée – valeur simulée). La valeur prédictive du modèle est beaucoup plus sensible aux méthodes d'estimation du RDT<sub>max</sub> et PMG<sub>max</sub> qu'aux méthodes d'estimation du αNG. Le paramétrage qui permet les meilleures prédictions par le modèle regroupe les méthodes suivantes : PMG<sub>max</sub> estimé par le quantile 75, RDT<sub>max</sub> estimé par le quantile 75 et αNG estimé en tenant compte de la somme en degré.jour entre le stade épi à 1cm et l'épiaison.

En moyenne, l'erreur de prédiction est de l'ordre de 10 q/ha<sup>-1</sup>, ce qui est courant pour les modèles dynamiques de culture. On peut remarquer qu'elle est plus forte en moyenne pour le traitement en azote limitant (11.1 q/ha<sup>-1</sup>) que pour le traitement potentiel (8.1 q/ha<sup>-1</sup>). Les Figures 2 présentent les rendements moyens observés et simulés pour les traitements potentiels et azote limitant. La plus forte erreur moyenne de prédiction en azote limitant est en partie due à une surestimation systématique du rendement. Une première analyse montre que cela pourrait être dû à une mauvaise estimation du nombre de grains par m<sup>2</sup> en situation de carence.



Figures 2 : Comparaison des rendements moyens simulés et observés pour (a) les traitements potentiels et (b) azote limitant (les abréviations des noms des variétés sont données dans le Tableau 1).

Une large gamme de variabilité est obtenue pour les valeurs des paramètres du modèle :

- le PMG<sub>max</sub> varie de 44.2 pour Parador à 57.1 g pour Euréka,
- le RDT<sub>max</sub> varie de 88.3 pour Espéria à 111.5 q/ha<sup>-1</sup> pour Bastide,
- le rapport du  $\alpha$ NG par rapport à celui de Soissons varie de 0.72 pour Renan à 1.10 pour Taldor.

#### **Analyse de sensibilité du modèle**

Le but de l'analyse de sensibilité est d'identifier les facteurs variétaux du modèle qui ont une influence significative sur les variables d'analyse du comportement variétal, c'est-à-dire les variables de sortie tel que le rendement. En plus des paramètres génotypiques exposés précédemment (PMG<sub>max</sub>, RDT<sub>max</sub> et  $\alpha$ NG), deux variables d'entrée dépendant de la variété ont été prises en compte dans cette analyse de sensibilité : la date des stades épi à 1 cm et floraison. L'objectif est donc de hiérarchiser et de quantifier les effets de ces cinq variables sur les variables de sortie du modèle. Cela permet d'identifier les variables qu'il est nécessaire d'estimer avec précision. Ainsi, une économie de moyen sur l'estimation des autres paramètres sera appréciée par les utilisateurs du modèle.

Pour déterminer la gamme de variation, nous nous sommes appuyés sur la gamme de valeurs observées au sein du réseau d'essais. Les valeurs retenues pour les variables d'entrée du modèle et les paramètres génotypiques représentent les valeurs maximales et minimales observées, ainsi que deux valeurs intermédiaires. L'analyse de sensibilité a été réalisée pour les deux pédoclimats de Mons (années d'essai 2004 et 2005). Trois niveaux de fertilisation azotée ont été considérés : carence précoce (apports 50 kg. ha<sup>-1</sup> épi à 1 cm et 60 kg. ha<sup>-1</sup> floraison), carence tardive (apports 50 kg. ha<sup>-1</sup> sortie hiver et 60 kg. ha<sup>-1</sup> épi à 1 cm) et niveau potentiel (apports 50 kg. ha<sup>-1</sup> sortie hiver, 100 kg. ha<sup>-1</sup> épi à 1 cm et 60 kg. ha<sup>-1</sup> floraison).

En moyenne, les rendements simulés sont de l'ordre de 60 q. ha<sup>-1</sup> pour la carence précoce et de l'ordre de 80 q. ha<sup>-1</sup> pour les deux autres traitements. Parmi les cinq facteurs génotypiques testés (RDT<sub>max</sub>, PMG<sub>max</sub>,  $\alpha$ NG, date de Floraison, date du stade épi 1 cm), quatre d'entre eux ont une influence significative sur le rendement. La date du stade épi 1 cm a beaucoup moins d'influence. Pour les deux traitements carencés en azote, on remarque globalement une forte influence du  $\alpha$ NG et donc de la capacité de la variété à produire un nombre de grains potentiel.

Dans une deuxième étape, l'analyse des simulations a porté sur l'interaction génotype x traitement azoté. L'interaction représente de l'ordre de 15 % de la variance totale ce qui est de l'ordre de grandeur de l'interaction obtenue dans le réseau d'essais du projet. En 2004, on constate que deux caractéristiques variétales expliquent majoritairement l'interaction génotype x traitement pour le rendement : la date de floraison et le RDT<sub>max</sub>. En 2005, l'interaction est principalement expliquée par le RDT<sub>max</sub>, puis de façon égale par la date de floraison, le PMG<sub>max</sub> et l' $\alpha$ NG. A nouveau, la date du stade épi 1 cm n'a qu'une influence très faible sur le résultat final, c'est-à-dire dans l'explication de l'interaction génotype x traitement.

Nous avons cherché à expliciter l'interaction date de floraison x traitement azoté en considérant uniquement les traitements extrêmes (carence précoce et potentiel). Cette analyse montre que les génotypes précoces sont moins sensibles à une carence en azote. En effet la

différence de rendement entre les deux traitements est de l'ordre de 15 q. ha<sup>-1</sup> pour une floraison du 21 mai et de l'ordre de 27 q. ha<sup>-1</sup> pour une floraison du 10 juin.

#### **► Absorption et remobilisation de l'azote**

##### **Objectifs**

Les deux objectifs sont :

- quantifier, grâce aux mesures faites à floraison et maturité, les différences génotypiques pour la capacité à absorber l'azote avant et après floraison et la capacité à remobiliser l'azote des parties végétatives vers les grains durant la phase de remplissage. De façon générale, environ 70-80 % de l'azote total sont absorbés avant floraison et ils vont constituer de l'ordre de 65-75 % de l'azote du grain à maturité,
- déterminer la part de l'écart à la relation rendement - teneur en protéines expliquée par l'absorption post-floraison et la remobilisation de l'azote.

##### **Absorption et remobilisation post-floraison**

Des différences significatives sont montrées entre génotypes pour la quantité d'azote absorbé après la floraison dans 8 milieux sur 12 et l'interaction génotype x dose d'azote (N limitant, potentiel) est significative dans deux situations sur quatre (Mons 2004 et Moulon 2005). Des différences significatives sont observées pour la quantité d'azote remobilisé dans 6 milieux sur 12 et l'interaction génotype x dose d'azote (N limitant, potentiel) est significative dans une situation sur quatre (Mons 2004).

Les génotypes absorbant le plus d'azote après la floraison sont Récital, Espéria, Courtôt, Nirvana, CF99102. Les variétés remobilisant le plus d'azote sont Grisby, Apache et Vivant. Sur la moyenne des milieux, on observe une corrélation négative entre l'azote absorbé avant et après floraison ( $r = -0.54$ ). Pour une même quantité d'azote à la floraison, les quantités d'azote absorbé après floraison peuvent être toutefois relativement différentes : par exemple 3.2 g. m<sup>-2</sup> (soit 32 kg. ha<sup>-1</sup>) pour CF99102, contre seulement 1 g. m<sup>-2</sup> (soit 10 kg. ha<sup>-1</sup>) pour Ritmo.

Des différences significatives entre variétés sont observées pour l'efficacité de remobilisation de l'azote (Azote remobilisé/Azote floraison) pour 5 milieux sur 12. Sur l'ensemble des milieux, la gamme de variation s'étale de 0.756 (Ritmo) à 0.801 (Isidor). Comme montré précédemment par Barbottin *et al.* (2005), la quantité d'azote absorbé à la floraison est le déterminant principal de la quantité d'azote remobilisé : sur l'ensemble des milieux, la quantité d'azote des parties aériennes à la floraison explique 86 % de la variation de la quantité d'azote remobilisé.

##### **Relation avec l'écart à la relation rendement - teneur en protéines**

Les valeurs obtenues pour la quantité d'azote remobilisé et la quantité d'azote absorbé post-floraison ont été corrélées avec l'écart à la relation rendement teneur en protéines (GPD) calculé précédemment. La corrélation n'est pas significative avec la quantité d'azote remobilisé. Si on considère chaque milieu individuellement, la corrélation n'est significative dans aucun des 12 milieux testés.

La corrélation est par contre significative avec la quantité d'azote absorbé en post-floraison qui explique environ 50 % du GPD. La corrélation est significative dans 9 des 12 milieux testés. Elle est la plus forte pour Mons 2005 à faible densité ( $r = 0.69^{***}$ ) et la plus faible au Moulon en 2005 en

azote limitant ( $r = 0.22ns$ ). Les trois milieux dans lesquels la corrélation n'est pas significative sont les trois milieux présentant la plus faible absorption post-floraison (Mons 2004 N limitant, Moulon 2004 N limitant, Moulon 2004 N potentiel).

## ► Analyses physiologiques

### Objectifs

L'azote est principalement absorbé avant floraison sous forme de nitrate qui va, dans un premier temps, être réduit en nitrite par la Nitrate Réductase (NR), puis en ammonium par la Nitrite Réductase. L'ammonium est ensuite incorporé dans les acides aminés par le cycle de la Glutamine Synthétase (GS) et de la Glutamate Synthase (GOGAT). Après la floraison, les protéines sont dégradées pour produire de l'ammonium et des acides aminés. Le recyclage de l'ammonium libéré au cours de l'hydrolyse des protéines va être notamment assuré par une forme cytosolique de la GS induite au cours du vieillissement des feuilles mais également par deux autres formes de l'enzyme présentes dans le tissu vasculaire (phloème en particulier). Une autre enzyme, la glutamate déshydrogénase (GDH), dont le rôle n'est pas complètement élucidé, pourrait intervenir dans la régulation du transport de l'azote par le phloème où l'enzyme est localisée. Chez le maïs et le riz, il a été montré par des analyses QTL (Quantitative Trait Loci) qu'une partie des variations observées pour des caractères agronomiques pouvaient être expliquées par des différences d'activité de ces enzymes (Yamaya *et al.*, 2002; Hirel and Gallais, 2004).

Le premier objectif de cette partie est d'abord d'estimer la variabilité génotypique présente pour les niveaux d'activité des trois enzymes NR, GS et GDH et la teneur en protéines de la feuille étandard (F1). Le deuxième est de rechercher des corrélations entre les activités enzymatiques et les différences de gestion de l'azote par la plante observées après la floraison (absorption, remobilisation, sénescence) ou les autres caractères agronomiques mesurés.

### Variabilité génotypique

Les analyses montrent une variabilité génotypique pour les trois activités enzymatiques (NR, GS, GDH) et la teneur en protéines de la feuille étandard aux deux stades de prélèvement (Floraison +14 et Floraison +28) situés dans la phase de remplissage du grain :

- la teneur en protéines varie de 98,1 (CF99102) à 137,1 mg.g<sup>-1</sup> (Equilibre) à floraison + 14j et de 66,1 (Quebon) à 108,0 mg.g<sup>-1</sup> (Soissons) à floraison + 28j,
- l'activité de la glutamine synthétase varie de 11,5 (Soissons) à 18,8 nmol g-GHM.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (Courtôt) à floraison + 14j et de 6,2 (Renan) à 13,3 nmol g-GHM.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (Soissons) à floraison + 28j,
- l'activité de la glutamate déshydrogénase varie de 0,59 (Cézanne) à 1,24 nmol NADH.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (Soissons) à floraison + 14j et de 0,89 (Récital) à 2,19 nmol NADH.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (Espéria) à floraison + 28j,
- enfin l'activité réelle de la nitrate réductase varie de 79,6 (Charger) à 218,5 nmol NO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (Pernel) à floraison + 14j et de 27,3 (Caphorm) à 138,5 nmol NO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (Espéria) à floraison + 28j.

La précision des mesures est relativement faible comme l'attestent les coefficients de variation qui sont de l'ordre de 11 % pour les teneurs en protéines et de l'ordre de 20-25 % pour les activités enzymatiques. L'utilisation de ces caractères pour une comparaison variétale reste donc

fortement dépendante d'une amélioration des techniques de mesure. Malgré cela, des différences significatives ont pu être mises en évidence entre génotypes.

A floraison + 14j, aucune corrélation significative n'existe entre les activités des trois enzymes. Par contre à floraison + 28j, les activités sont corrélées entre elles (coefficient de corrélation de 0.41 à 0.62). On peut certainement voir dans ce phénomène une liaison avec la sénescence de la feuille. Une variété dont la feuille étandard serait fortement sénescence aura une faible activité enzymatique quelle que soit l'enzyme considérée. Ce résultat a déjà été observé par Kichey *et al.* (2006). Aucune corrélation significative n'existe aussi entre les activités mesurées pour la même enzyme aux deux dates de prélèvements. Le comportement des variétés va donc être très différent entre les deux dates de prélèvements. Enfin, il existe généralement une corrélation négative entre les activités et la date de floraison, les variétés tardives ayant des activités plus faibles.

### Corrélation avec les variables agronomiques

Des corrélations ont été recherchées entre les mesures physiologiques et plusieurs des caractères agronomiques mesurés dans les parties précédentes (GPD, absorption et remobilisation de l'azote). Les principaux résultats sont :

- pour les six caractères agronomiques considérés, le nombre de corrélations positives avec les mesures physiologiques va de 1 (GPD) à 10 (Absorption azote post-floraison). Elles sont positives (teneur en protéines, rendement en azote, GPD et absorption d'azote post-floraison) ou négatives (rendement en grain, remobilisation). La plus forte corrélation est de 0.56, ce qui fait une explication au maximum de 30 % de la variation du caractère,
- une corrélation positive ( $r=+0.56$ ) entre la quantité d'azote absorbé en post-floraison et l'activité potentielle de la nitrate réductase. Ce résultat confirme ceux déjà obtenus par Kichey *et al.* (2006, 2007). On trouve aussi des corrélations significatives mais plus faibles avec les activités de la GS et de la GDH et la teneur en protéines de la feuille étandard,
- une relation positive ( $r = +0.49$ ) entre l'activité de la GDH à floraison + 14 jours et l'écart à la relation rendement/teneur en protéines. C'est la seule corrélation positive significative observée pour cette variable. On retrouve cette corrélation en considérant cette fois la teneur en protéines du grain. Le rôle physiologique de cette enzyme reste hypothétique mais si elle intervient dans la régulation du transport de l'azote au niveau du phloème, on peut supposer qu'une plus forte activité de la GDH se traduirait par une plus grande quantité d'azote disponible pour le grain. Chez le maïs, il a été montré que des QTL de rendement en grain co-localisent avec des QTL d'activité GDH (Gallais *et al.*, 2004).

## ► Suivi des profils d'azote minéral dans le sol

### Objectifs

L'objectif de cette partie est le suivi du contenu en azote minéral du sol à différentes périodes clés du cycle de développement de six variétés témoins différenciées quant à leur aptitude à valoriser l'azote pour mesurer leur impact potentiel sur l'environnement. Les six variétés sont Apache, Arche, Charger, Récital, Ritmo et Soissons. Par ailleurs, pour la variété Soissons, des mesures ont été réalisées sur différentes modalités de disponibilité en azote du milieu.

### Évolution des profils d'azote minéral

La Figure 3a montre un exemple d'évolution au cours du temps des profils d'azote minéral pour la variété Apache et le traitement N potentiel de l'essai de Mons 2004. A l'implantation (20 Octobre 2003), la quantité d'azote minéral s'élève à 42 kg N.ha<sup>-1</sup>, localisée principalement en surface. Après l'hiver, on retrouve 44 kg N.ha<sup>-1</sup>, qui ont légèrement migré en profondeur sous l'effet de la pluviométrie automnale et hivernale. A la floraison, l'azote mesuré dans l'horizon de surface (65 kg N.ha<sup>-1</sup>) correspond à une partie du dernier apport d'engrais non encore absorbée par la culture ; il ne reste pratiquement plus d'azote minéral dans les horizons plus profonds. A la récolte, il ne reste que 30 kg N.ha<sup>-1</sup> sur l'ensemble du profil. Le même type d'évolution des profils d'azote minéral, au cours du temps, est observé pour l'ensemble des six variétés témoins et pour les deux campagnes d'expérimentation.

La Figure 3b présente les profils d'azote minéral mesurés à la récolte pour les six géotypes sur le traitement N potentiel de l'essai de Mons. Un reliquat minimal d'environ 20 kg N.ha<sup>-1</sup> est atteint sur la profondeur de sol 30-150 cm pour l'ensemble des géotypes qui présentent une forte aptitude à valoriser l'azote disponible du sol sur la profondeur exploitée par les racines ; ce constat est d'ailleurs observé pour l'ensemble des situations pédoclimatiques expérimentales et l'épuisement en azote minéral des horizons du sol sous-jacents à l'horizon de surface est souvent atteint dès le stade floraison (forte absorption au cours de la montaison). La quantité d'azote minéral en surface (0-30 cm) varie de 13 à 23 kg N.ha<sup>-1</sup> sur le traitement N potentiel de Mons selon les variétés et correspond à la minéralisation de l'azote organique du sol pendant la période date de fin d'absorption - date de mesure du reliquat. Il n'y a pas de différence importante entre les variétés. On a pu observer des quantités d'azote minéral en surface pouvant atteindre 45 kg N.ha<sup>-1</sup> ; celles-ci sont fonction de la durée de la période fin d'absorption - date de mesure du reliquat, du type de sol (teneur en matière organique) et des conditions climatiques (température et humidité du sol) durant la phase post-absorption.

Des mesures de profils d'azote ont été réalisées à maturité pour la variété Soissons sur différents traitements : N potentiel, N limitant et faible densité. Les résultats

montrent qu'en fonction de la disponibilité en azote, comprenant l'azote fourni par le sol et l'azote apporté par l'engrais, on observe une tendance à un épuisement du sol plus intense en situation limitante. Les mesures indiquent également une tendance à un reliquat récolte un peu plus élevé dans le traitement faible densité.

### Effet de la disponibilité en azote sur l'absorption

L'apport d'engrais azoté influence la quantité d'azote absorbé. Un troisième apport d'azote de 60 kg N.ha<sup>-1</sup> a été réalisé le 14 Mai 2004 sur le traitement N potentiel de l'essai de Mons. Les profils d'azote minéral ont été mesurés à la floraison le 27 Mai pour Soissons, Apache et Récital, et le 7 Juin pour Arche, Charger et Ritmo. Les profils mesurés le 27 Mai montrent des valeurs plus élevées d'environ 34 kg N.ha<sup>-1</sup> avec une localisation de l'azote en surface. Cet azote correspond à la partie du troisième apport d'engrais non encore absorbée par la culture. A la floraison, on observe un écart d'environ 30 kg N sur l'absorption entre les 2 groupes de variétés. La fertilisation azotée, en particulier la position de la date d'apport par rapport au stade de développement de la culture, peut influencer sur les quantités d'azote absorbé à la floraison. Plus généralement, l'absorption d'azote à la floraison, l'absorption post-floraison, la remobilisation,... doivent être interprétées au regard de la disponibilité en azote du sol et des apports d'engrais azotés (doses et particulièrement dates d'apport).

Sur les essais de Mons et du Moulon, l'azote disponible et l'absorption à la récolte ont été comparés pour les six géotypes (Apache, Arche, Charger, Récital, Ritmo et Soissons) et différents traitements. La quantité d'azote disponible est estimée par (reliquat initial - reliquat final) + N engrais, le reliquat initial correspondant à la quantité d'azote minéral du sol en sortie d'hiver et le reliquat final à l'azote minéral du sol à la récolte. On fait l'hypothèse dans cette estimation que la minéralisation nette de l'azote du sol, l'organisation microbienne et les pertes par voie gazeuse aux dépens de l'engrais sont identiques pour les six géotypes. Les valeurs d'azote disponible et d'azote absorbé à la récolte sont relativement proches pour les divers traitements (N potentiel, N limitant et faible densité), indiquant une bonne valorisation de l'azote par les différents géotypes.

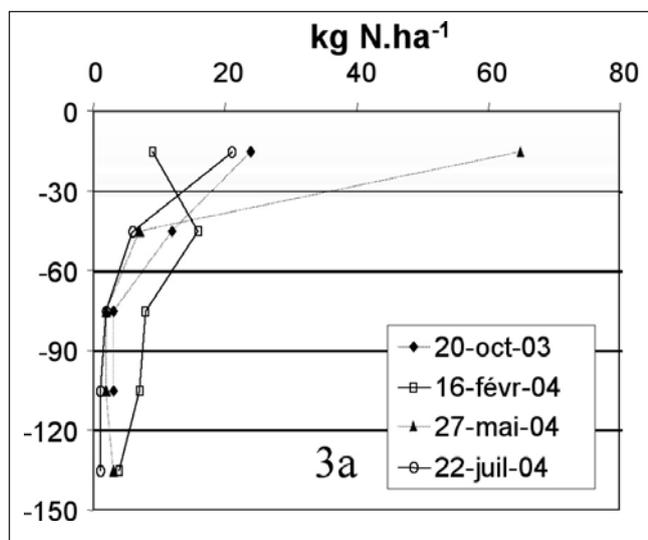


Figure 3a : Évolution des profils d'azote minéral pour la variété Apache mesurés à quatre dates (implantation, sortie hiver, floraison, maturité) sur le traitement N potentiel de Mons 2004.

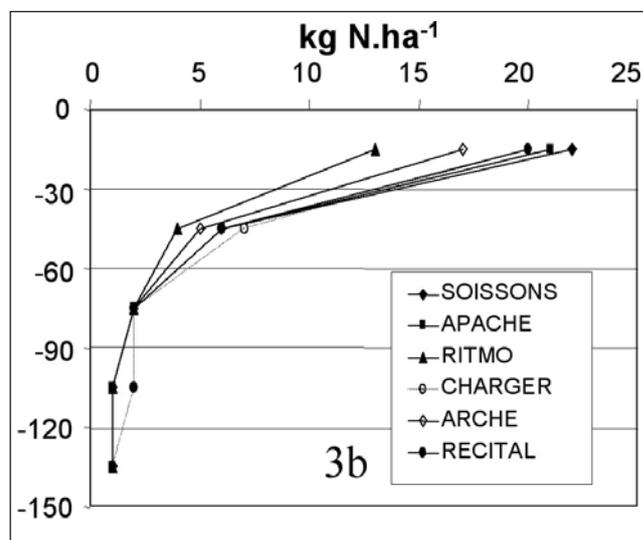


Figure 3b : Profils d'azote minéral à maturité pour les six géotypes sur le traitement N potentiel de l'essai de Mons.

### 3. Conclusions générales et perspectives

En conclusion, des différences significatives entre génotypes ont été observées pour l'ensemble des caractères agronomiques ou physiologiques mesurés au champ et en conditions contrôlées. Nous avons confirmé l'existence d'une variabilité génotypique pour la tolérance à une carence en azote et pour un écart positif à la relation rendement-teneur en protéines. De plus, des génotypes peuvent être favorables à la fois pour le GPD et leur réponse à l'azote limitant. Nous avons aussi montré l'existence de différences pour les valeurs des paramètres génotypiques du modèle de fonctionnement Azodyn, pour les quantités d'azote absorbé ou remobilisé après floraison et pour les activités de trois enzymes du métabolisme de l'azote.

Nous avons avancé dans la connaissance du déterminisme du GPD en montrant l'importance de la quantité d'azote absorbé après la floraison. Dans nos conditions, la quantité d'azote remobilisé après la floraison ne s'est pas révélée explicative des différences variétales. Le suivi des profils d'azote minéral dans le sol a toutefois montré que la disponibilité en azote aux stades clés de développement des variétés va dépendre de leur rythme de développement en interaction avec les dates d'apports d'azote et les conditions climatiques. Dans des essais comportant de nombreuses variétés, où il serait difficile d'individualiser les dates d'apports d'azote, une partie des différences observées entre variétés pourrait provenir de cette interaction avec la gestion de l'azote.

Nous avons enfin apporté des pistes de recherche pour le développement d'outils d'aide à la sélection. Nous avons pu proposer une méthode simplifiée de paramétrage génotypique pour le modèle de fonctionnement Azodyn qui peut être adaptée à une série relativement large de variétés. Cette étape est une première base pour permettre l'utilisation de ce type de modèle, au moins dans les étapes finales d'un programme de sélection sur une série limitée de lignées avancées. Nous avons pu montrer l'intérêt de deux enzymes dans la caractérisation de métabolisme de l'azote après la floraison. Leur utilisation passe toutefois par des phases de validation et de mise au point de méthodologie de mesures pour en améliorer la répétabilité.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées sur la base de ces résultats. Tout d'abord, la bonne relation entre quantité d'azote absorbé et GPD demande à être vérifiée dans des

conditions plus variées de disponibilités en azote. Le réseau expérimental que nous avons utilisé est principalement situé dans le nord de la France et nous avons, sauf une fois (Mons 2005), favorisé les apports d'azote plutôt précoces. Des situations expérimentales plus défavorables pour le remplissage du grain (plus fortes températures, sécheresse) pourraient révéler l'importance d'autres processus que l'absorption post-floraison. De même, des fractionnements différents, en particulier des apports d'azote tardifs, pourraient modifier le comportement des variétés. Comme nous l'avons vu, une bonne caractérisation des disponibilités en azote, si possible pour chaque génotype, devrait être réalisée aux stades clés de développement. On peut penser pour cet aspect à l'utilisation de modèles qui permettrait de déterminer les indicateurs du milieu (azote, eau) les plus pertinents. L'ensemble des résultats générés, complété éventuellement par de la simulation, permettrait aussi d'aborder la question du choix du milieu permettant de révéler avec la plus grande probabilité les génotypes favorables. L'identification du milieu et de la conduite culturale permettant de mettre en évidence des variétés GPD+ engendrerait des économies de moyens lors de mise en place des expérimentations.

Une des limites de cette étude réside dans la difficulté de déterminer facilement et précisément la gestion de l'azote après la floraison. L'estimation de la quantité d'azote absorbé et remobilisé durant le remplissage du grain est coûteuse en temps et en moyen car il faut prélever la biomasse aérienne à la floraison et à la maturité puis réaliser des analyses d'azote. Il serait nécessaire pour avancer sur des séries variétales importantes de recenser et de tester des méthodes rapides permettant d'estimer les quantités d'azote absorbées par la culture à la floraison et à la maturité.

Grâce à un important réseau expérimental, cette étude a permis d'identifier des génotypes montrant des écarts à la relation rendement-teneur en protéines que l'on peut qualifier de robustes. Quelques génotypes s'écartant positivement et négativement de cette relation pourraient être choisis et serviraient à valider l'intérêt des mesures d'activités enzymatiques. Parce qu'elles sont longues à réaliser, les activités enzymatiques n'ont été mesurées que dans un lieu et à un niveau d'azote. Une série de génotypes plus restreinte permettrait de regarder les corrélations entre ces activités et les caractères agronomiques d'intérêt dans des situations plus variées.

### Références bibliographiques

**Barbottin A.**, (2004) Utilisation d'un modèle de culture pour évaluer le comportement des génotypes : pertinence de l'utilisation d'Azodyn pour analyser la variabilité du rendement et de la teneur en protéines du blé tendre. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur de l'INA-PG, 178 pp.

**Barbottin A.**, Lecomte C., Bouchard C., Jeuffroy M.-H., (2005) Nitrogen Remobilization during Grain Filling in Wheat: Genotypic and Environmental Effects. *Crop Science* 45 : 1141-1150

**Gallais A.**, Hirel B., (2004) An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *Journal of Experimental Botany* 55 : 295-306

**Herbain C.**, (2006) Utilisation du modèle AZODYN pour prévoir le comportement des variétés de blé tendre d'hiver vis-à-vis de nutriments azotés sub-optimales. Rapport de Master 2 de l'IUP-PVIA de l'université Picardie Jules Verne d'Amiens.

**Hirel B.**, Andrieu B., Valadier M.-H., Renard S., Quilleré I., Chelle M., Pommel B., Fournier C., Drouet J.-L., (2005) Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays* L.) leaves, during grain filling. *Physiol Plant* 124 : 178-188.

**Jeuffroy M.-H.**, Recous S., (1999) Azodyn: a simple model simulating the date of nitrogen deficiency for decision support in wheat fertilization. *European Journal of Agronomy* 10 : 129-144

**Kichey T.**, Heumez E., Pocholle P., Pageau K., Vanacker H., Dubois F., Le Gouis J., Hirel B., (2006) Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat (*Triticum aestivum* L.). Dynamic and integrated views highlighting the central role of the enzyme glutamine synthetase. *New Phytol* 169 : 265-278.

**Kichey T.**, Hirel B., Heumez E., Dubois F., Le Gouis J., (2007) Wheat genetic variability for post-anthesis nitrogen absorption and remobilisation revealed by <sup>15</sup>N labelling and correlations with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crop Res* 102 : 22-32.

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