

Jacques LE GOUIS^{*1,2}, Vincent ALLARD^{1,2}, Jean-Louis JOSEPH^{1,2}, Frédéric HENRY^{1,2}, François TAULEMESSSE^{1,2}, Emmanuel HEUMEZ³, Katia BEAUCHENE⁴, David GOUACHE⁴, Volker LEIN⁵, Pascal GIRAUDEAU⁶, Stephen SUNDERWIRTH⁷, Jean-Michel DELHAYE⁸, Frank LACOUDRE⁹, Céline DUQUE⁹, Jérémy DERORY¹⁰, Clément DEBITON¹¹, Philippe LEREBOUR¹¹, Laure DUCHALAIS¹², Sylvie DUTRIEZ¹³

1 - INRA - UMR GDEC, Domaine de Crouelle, 5 chemin de Beaulieu, 63109 Clermont-Ferrand
 2 - UBP - UMR GDEC, Campus des Cézeaux, 63177 Aubière Cedex
 3 - UE - GCIE, 2 Chaussée Brunehaut, 80203 Péronne
 4 - Arvalis Institut-du-Végétal, IBP- Rue de Noetzlin, 91405 Orsay
 5 - Saaten-Union Recherche, 163 Avenue de Flandre, 60190 Estrées-Saint-Denis
 6 - SECOBRA Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule
 7 - Momont, 154 Route Nationale, 28150 Allones
 8 - Lemaire-Deffontaines, 108 Rue du Rossignol, 59310 Auchy-lès-Orchies
 9 - Limagrain Europe, Ferme de l'Etang, 77 390 Verneuil l'Etang
 10 - Limagrain Europe, Centre de Recherche, route d'Ennezat - Bâtiment 1 - CS 3911 - 63720 Chappes
 11 - UNISIGMA, 2 Rue Petit-Sorri, 60 480 Froissy
 12 - RAGT2n, Route d'Epincy, 28150 Louville-la-Chenard
 13 - Caussade Semences, 24, rue Saint Pierre, 28150 Reclainville
 * Coordinateur : Jacques LE GOUIS, jacques.legouis@clermont.inra.fr

1. Introduction

L'azote est un élément nutritif essentiel de la culture de blé tendre pour sa forte influence sur le rendement et sur la teneur en protéines. Les apports moyens sont de l'ordre de 162 kg ha⁻¹ (Agreste 2011) ce qui représente une large part des engrais azotés consommés annuellement en France. Cela se traduit par un coût relativement important pour l'agriculteur, environ 20-25% des charges opérationnelles. De plus, la production, le transport et l'application des engrais minéraux sont très consommateurs en énergie, le prix des engrais azotés a donc tendance à suivre le prix du pétrole. Ainsi leur prix a plus que doublé entre 2000 et 2013 (INSEE). Un des moyens de diminuer ces charges est d'améliorer l'efficacité d'absorption de la culture. En effet seuls environ 50-60% de l'azote disponible pour la culture sera réellement absorbé (Sylvester-Bradley et Kindred 2009). Une partie est perdue par lixiviation entraînant une pollution des eaux de surface et des nappes phréatiques. Une autre partie est volatilisée sous forme d'oxyde nitreux (N₂O), un gaz à effet de serre au pouvoir radiatif 310 fois plus fort que le CO₂. Ainsi, les engrais azotés seraient responsables d'environ 50% des émissions de gaz à effet de serre d'origine agricole et les émissions de N₂O en provenance des sols agricoles devraient encore augmenter de 35-60% (IPCC, 2007) à l'horizon 2030. Une stratégie pour améliorer ce bilan pourrait être de retarder les apports d'azote tout en associant des types variétaux ayant une forte capacité à absorber l'azote post-floraison.

L'efficacité d'utilisation de l'azote peut être définie comme la quantité de grains produits par unité d'azote disponible. Elle peut être décomposée en une efficacité d'absorption (quantité d'azote absorbée par rapport à l'azote disponible) et une efficacité de conversion (quantité de grains produits par unité d'azote absorbée). Il a été montré qu'il existait des différences génotypiques significatives pour ces caractères (e.g. Van Sanford et MacKown 1986 ; Fossati *et al* 1993). Il existe aussi une variabilité de comportement des génotypes de blé vis à vis d'une déficience en azote qui se traduit par des interactions génotype x niveau d'azote (Le Gouis *et al* 2000). Nous avons de plus montré dans un précédent projet FSOV (Bogard *et al* 2010) qu'il existait une variabilité génétique pour l'écart à la relation rendement teneur en protéines (dénommé GPD, pour *Grain Protein Deviation*, par Monaghan *et al* 2001) confirmant en ceci des résultats de Oury *et al* (2003). L'ensemble de ces résultats tendent à démontrer l'existence d'une forte variabilité génétique quant à l'assimilation et l'utilisation des ressources azotées ce qui constitue donc une piste de recherche pour l'identification de caractères physiologiques ou génétiques permettant une utilisation optimale de l'azote par la culture.

Le coefficient d'utilisation de l'azote provenant de l'engrais dépend du stade auquel il est appliqué. Les apports d'azote précoces sont mal utilisés par la culture du fait d'une faible croissance et donc d'une demande limitée de la culture à ce stade. Très rapidement l'engrais non absorbé par la culture peut être lixivié, volatilisé ou immobilisé par la microflore

du sol. Les apports d'azote tardifs, jusqu'à l'épiaison, sont donc souvent plus efficacement utilisés (Lopez-Bellido *et al* 2006) sans que le déficit azoté précédant l'apport ait un réel impact négatif sur le rendement. Il a de plus été montré que les différences variétales pour l'absorption d'azote post-floraison expliquaient environ 50% de la variabilité pour le GPD (Bogard *et al* 2010). Ainsi les variétés capables d'absorber plus d'azote après la floraison ont généralement une plus forte concentration en protéines pour un rendement équivalent. Il semble donc que des apports d'azote tardifs permettent non seulement d'optimiser en moyenne l'efficacité de l'utilisation de l'azote mais aussi de maximiser l'expression des caractères positifs de certains géotypes.

Néanmoins cette stratégie de report des apports d'azote repose sur deux conditions nécessaires. La première est que les conditions climatiques actuelles et futures, en particulier celles déterminant la disponibilité en eau pour la culture, soient favorables pour une absorption et utilisation efficaces de l'azote. Ceci doit particulièrement être considéré dans le cadre du changement climatique qui risque de se traduire par une augmentation concomitante des épisodes de sécheresse et des besoins en eau (élévation de la température moyenne) durant la fin du cycle de développement du blé (Gate *et al* 2008). Aucune étude prospective n'a pour l'instant été conduite pour estimer dans quelles situations et avec quelle fréquence une stratégie d'apport d'azote tardif serait efficace dans un contexte climatique donné. La deuxième condition est que les variétés soient toujours capables d'absorber l'azote après la floraison si les conditions sont favorables. Il est connu qu'il existe des différences variétales pour la quantité d'azote absorbée post-floraison (Löffler *et al* 1985 ; Van Sanford et McKown 1986). Mais le déterminisme génétique de ces différences n'est pas connu. De plus, de fortes interactions avec la date de floraison existent, ce qui peut introduire des biais dans cette estimation. Les modèles de simulation sont généralement basés sur le calcul d'un besoin en azote par la plante et d'une offre par le sol pour déterminer la quantité d'azote absorbé et l'arrêt de l'absorption. Ils font souvent abstraction de la diminution de la capacité d'absorption au sens strict et dans tous les cas rendent difficile l'analyse de possibles différences variétales pour ce caractère. De ce fait les modèles sont relativement limités pour bien estimer des différences variétales pour l'azote absorbé après la floraison. Ceci est d'autant plus préoccupant que de

relativement faibles différences peuvent se traduire par des effets importants sur la teneur en protéines. Ainsi 1 point de protéines à 80 q ha⁻¹ correspond seulement à une différence d'absorption de 15-20 kg N ha⁻¹.

L'objectif de ce projet est donc de mieux comprendre la dynamique d'absorption post-floraison et les variables qui la contrôlent dans le but (1) de tester des scénarios de gestion de l'azote optimaux pour des objectifs donnés et (2) d'explorer la variabilité génétique existante afin d'identifier le déterminisme génétique d'une forte valorisation des apports d'azote tardifs. Le programme est décomposé en quatre volets. Le premier volet a pour objectif d'analyser, notamment par simulation, les interactions pédo-climat x stratégie de fertilisation x précocité variétale. Le deuxième volet a pour objectif une analyse fine de la dynamique d'absorption d'azote post-floraison en conditions contrôlées. Le troisième volet a pour but d'analyser la variabilité génétique pour l'absorption post-floraison en contrôlant la date de floraison. Enfin le dernier volet aura pour objectif de fournir des données qui serviront à une première analyse du déterminisme génétique du GPD par étude d'association.

2. Matériel et méthodes

Volet 1

Les données expérimentales regroupent d'une part le réseau des essais Arvalis dits « PMOD » et des essais mettant en œuvre des modalités plus contrastées (azotées, fongicides, écartements de semis, vernalisation...). Nous avons éliminé toutes les données dont la protection phytosanitaire, l'écartement de semis et la vernalisation ne correspondaient pas à une conduite standard. Dans un premier temps, les modalités sans ou à faible fertilisation azotée ont donc été conservées. Nous avons choisi de ne travailler que sur quatre variétés, bien représentées : Soissons, Apache, Charger et Caphorn. En tout, 373 essais ont ainsi été conservés, couvrant les années 1997 à 2011 et différents types de sols (limons, argilocalcaires et argilocalcaire superficiels, craie, graviers,...). Les données mobilisées ont été les biomasses mesurées à floraison et à la récolte (grains et pailles) et les teneurs azotées correspondantes. Ces mesures ont permis de calculer les quantités d'azote absorbées (et les indices de nutrition azotée, INN) à floraison

(QNflo) et à la récolte (QNrécolte), et, par différence, la quantité d'azote absorbée post-floraison (PANU). La quantité d'azote remobilisée (QNR) a été calculée comme la quantité d'azote à floraison moins la quantité d'azote dans les pailles à la récolte. Les droites de régression rendement – concentration en protéines ont été calculées selon la méthode proposée par Oury & Godin (2007). L'approche a été menée séparément pour chacune des quatre variétés.

D'autre part, le modèle SiriusQualityV1 (Martre *et al* 2003) a été utilisé pour des simulations. Le modèle permet de simuler sur une base journalière la croissance et le développement d'une culture de blé. La variété qui a servi de base aux simulations est la variété Thésée dont nous avons fait varier les paramètres de réponse à la vernalisation et à la photopériode générant ainsi des génotypes couvrant une large gamme de précocité. En complément, plusieurs dates de semis ont aussi été simulées pour élargir encore cette gamme de précocité. Les scénarios climatiques envisagés correspondent à différentes situations géographiques du territoire français et à différents contextes socio-économiques futurs définis par le GIEC (Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat). Les trois scénarios climatiques retenus sont : B1 (modéré), A1B (médian), A2 (extrême). Ceux-ci se traduisent par des prédictions différentes en termes de concentration en CO₂ de l'atmosphère et d'impact sur le climat. Les données climatiques correspondantes à ces scénarios climatiques sont mises à disposition par Météo France sur le site www.drias-climat.fr/. Trois périodes de 30 ans ont été considérées pour les simulations : période de référence (1961-1990), futur proche (2021-2050) et futur lointain (2071-2100). Six lieux représentant la moitié nord de la France ont été choisis (Estrées-Mons, Pontivy, Etampes, Mirecourt, Niort, Clermont-Ferrand). Les six stratégies de fertilisation choisies couvrent deux aspects, à savoir la quantité d'azote totale apportée et sa répartition dans le temps sur la culture, apport classique vs apport tardif. Les apports sont effectués à quatre différents stades de développement.

Volet 2

Des plantes de blé (cv Récital) ont été conduites en conditions contrôlées à quatre niveaux contrastés d'azote dans la solution de fertirrigation (1, 4, 7 et 10

mM ; modalités respectivement nommées N1, N4, N7 et N10) jusqu'à floraison. Un système de culture semi-hydroponique de plantes en tubes sur substrat neutre (perlite/sable) a été employé pour cela. Ce protocole pré-floraison a permis de disposer de plantes ayant des niveaux de nutrition azotée contrastés à floraison. Pendant la période post-floraison, l'ensemble des plantes a été soumis à un régime de fertirrigation unique et non-limitant (10 mM). Afin de mesurer finement l'absorption d'azote sur la phase post-floraison, des marquages ¹⁵N courts ont été réalisés en cinétique lors de huit prélèvements destructifs, positionnés approximativement tous les 100°Cj (DJ) de floraison (Z65) à maturité. Des échantillons de quatre types d'organes (feuilles, tiges, racines et épis) ont parallèlement été congelés en vue de dosages d'ions et métabolites, ainsi que d'expression de gènes liés au métabolisme azoté. Des amorces qRT-PCR ont été développées pour dix gènes majeurs impliqués dans l'absorption, la réduction et l'assimilation de l'azote, comprenant deux transporteurs racinaires de nitrate à basse affinité (NRT1), deux transporteurs racinaires de nitrate à haute affinité (NRT2), la nitrate réductase (NR), la nitrite réductase (NiR), la glutamine synthétase 2 (GS2), la glutamine oxoglutarate aminotransférase (GOGAT), l'asparagine synthétase (ASN) et la glutamate déshydrogénase (GDH).

Volet 3

Deux groupes de 20 variétés ont été constitués sur la base de la précocité d'épiaison. Les lignées ont été choisies parmi celles testées dans le projet FSOV 2008 « Caractérisation du rythme de développement du blé tendre pour des variétés adaptées aux risques climatiques » coordonné par Michel Rousset (INRA UMR GV Moulon). Dans l'ensemble, ces variétés sont des variétés récentes inscrites en France ou au catalogue européen. Les variétés ont été sélectionnées pour maximiser la différence de précocité à l'épiaison entre les deux groupes (de l'ordre de 7 à 10 jours) et minimiser les différences à l'intérieur de chacun des deux groupes (de l'ordre de deux à trois jours). Deux stratégies de fertilisation azotée ont été expérimentées, visant à estimer les capacités des variétés à absorber de l'azote post-floraison avec des statuts azotés différents à floraison. Les apports sont calculés selon la méthode du bilan qui permet d'estimer une dose de référence (X). Les deux stratégies sont ensuite différenciées par

les apports pré-floraison ($N = X - 50 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$, $N+ = X + 50 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$), les dates du dernier apport à l'épiaison étant adaptées en fonction du groupe de précocité des variétés.

Chaque année, sept lieux d'essai ont été utilisés. Les expérimentations 2011 ont été réalisées entre Auchy dans le département du Nord et Clermont-Ferrand dans le Puy-de-Dôme. Celles de 2012 ont été réalisées entre Saultain dans le département du Nord et Clermont-Ferrand dans le Puy-de-Dôme. Les apports d'azote s'échelonnent de 100 à 150 $\text{kg ha}^{-1} \text{ N}$ pour le faible niveau d'azote et de 200 à 250 $\text{kg ha}^{-1} \text{ N}$ pour le fort niveau d'azote.

Une expérimentation complémentaire a été mise en place en 2011 à Clermont-Ferrand sur 10 variétés de la série précoce. Pour chacune des variétés, 4 microparcelles ont été semées, pour constituer deux traitements et deux répétitions. Les deux traitements se différencient par la date d'apport de 50 $\text{kg ha}^{-1} \text{ N}$ marqué à 1% ^{15}N (à floraison ou floraison + 250 °Cj). Sur chaque micro-parcelle une placette de 4 rangs de 0.5m (0.32 m^2) a été prélevée avant l'apport d'azote à floraison ou floraison + 250 °Cj et à maturité dans la partie ayant reçu l'azote marqué. La matière sèche aérienne totale a été estimée à floraison ou floraison + 250 °Cj et à maturité en séparant les grains des parties végétatives. Des échantillons de poudre des parties végétatives et des grains ont été envoyés à l'UC Davis Stable Isotope Facility (Davis, CA, USA) pour la détermination de la concentration en azote total et l'abondance ^{15}N .

Volet 4

Le panel de lignées du projet BreedWheat est composé de 220 variétés de blé tendre pour la plupart inscrites (213/220) en France (161/220) ou dans d'autres pays européens, la majorité entre 2003 et 2012. Ces variétés ont été cultivées dans 10 lieux en 2013. Dans chaque lieu, sauf Clermont-Ferrand, un seul traitement azoté a été réalisé. Les essais étaient non répétés à l'exception de quatre témoins (Apache, Altigo, Bermude, Premio) répétés six fois dans un dispositif en sous-blocs. Les principales mesures réalisées ont été : le rendement, la concentration en protéines, la date d'épiaison, le poids spécifique et la hauteur des plantes.

3. Résultats et discussion

GPD dus à l'environnement et relation aux mécanismes de variation génotypique du GPD

En amont des simulations des interactions pédo-climat x stratégie de fertilisation x précocité variétale, les bases de données disponibles à Arvalis ont été ré-analysées pour rechercher des relations empiriques entre les différents processus régissant le fonctionnement azoté de la culture.

Les droites de régression rendement concentration en protéines ont été établies pour le calcul de GPD pour quatre variétés. Les relations sont significatives mais la relation apparaît nettement plus faible pour Soissons comparativement aux autres variétés. Les résultats obtenus sur ce cultivar seront donc sujets à caution.

L'analyse des corrélations des caractères estimés avec le GPD permet de mettre en évidence (Tableau 1) que (1) les corrélations sont très faibles pour Soissons (on suppose que c'est lié aux difficultés d'établir une relation rendement-protéines fiable sur ce cultivar avec nos données), (2) et hors Soissons, les deux variables les plus explicatives du GPD sont l'INN floraison et l'écart à la relation azote absorbé post-floraison (PANU) – azote remobilisé (QNR).

Tableau 1 : Relation entre le GPD et les caractères mesurés pour chacune des quatre variétés.

Corrélation avec GPD	Apache	Caphom	Charger	Soissons
Quantité N floraison	0.53	0.60	0.37	0.04
INN floraison	0.58	0.68	0.52	0.05
PANU	0.12	0.05	0.10	0.10
Quantité N remobilisé	0.44	0.43	0.18	0.02
Ecart PANU-QNR	0.66	0.55	0.49	0.17

La relation GPD – INN floraison met en évidence que le statut azoté de la culture à floraison est un déterminant important des variations environnementales de GPD (Figure 1). On remarque aussi que l'INN floraison constitue un très bon indicateur du GPD : sur ces données un INN floraison

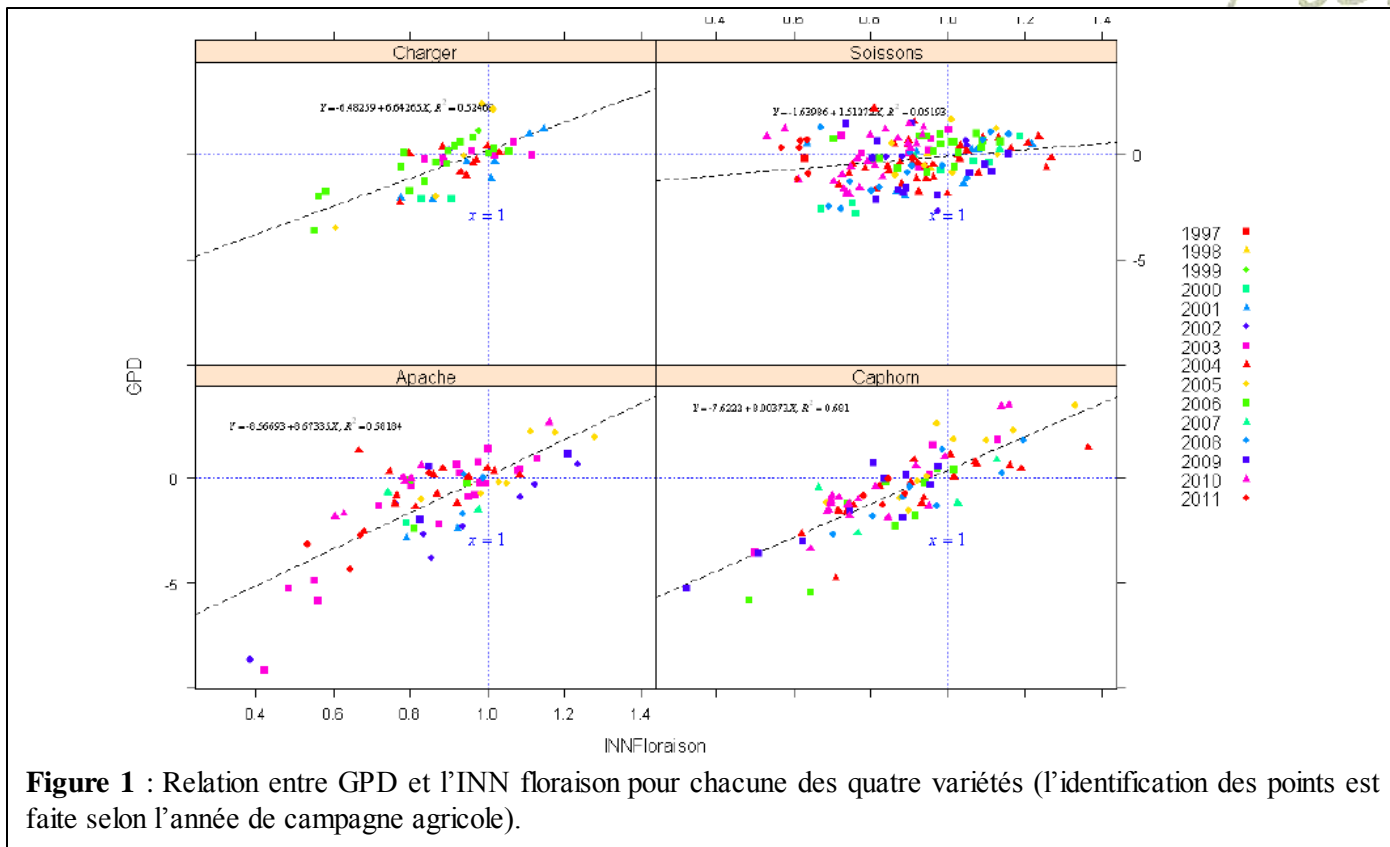


Figure 1 : Relation entre GPD et l'INN floraison pour chacune des quatre variétés (l'identification des points est faite selon l'année de campagne agricole).

supérieur à 1 conduit presque systématiquement à un GPD positif, et inversement.

La même chose peut être dite de l'écart absorption post-floraison - remobilisation (PANU-QNR): dès que celui-ci est supérieur à la tendance, le GPD est positif. Autrement dit, tout surplus d'absorption post-floraison pour une même absorption pré-floraison augmente d'autant le taux de protéines. Ce dernier résultat est conforme à celui obtenu par Bogard *et al* (2010) pour expliquer les variations génotypiques de GPD. Parmi les hypothèses avancées lors de son travail, et dans celui sur le «*stay green*» du sorgho de Borrel *et al* (2001), l'idée avancée est celle d'un cercle vertueux entre absorption post-floraison et maintien de la durée de vie verte du couvert. Cette hypothèse nous a conduit à observer la relation entre l'écart PANU-QNR et la biomasse produite par la culture lors de la phase de remplissage : si cette dernière est élevée, c'est que le fonctionnement du couvert a été bon pendant une longue durée. On retrouve effectivement une corrélation intéressante entre ces deux grandeurs.

Analyse des interactions pédo-climat x stratégie de fertilisation x précocité variétale

La comparaison des trois scénarios climatiques considérés montre une augmentation de la teneur atmosphérique en CO₂ passant de 325 ppm à 650

ppm, une augmentation des températures moyennes annuelles d'environ 4°C, une diminution de la pluviométrie et une augmentation du rayonnement global sur la période. Globalement les évolutions seraient comparables entre les milieux pour les températures et les rayonnements. La diminution de la pluviométrie serait plus marquée à l'ouest que dans le reste des lieux. Les changements seraient plus marqués pendant la période estivale que la période hivernale.

Etant donné que le modèle SiriusQualityV1 ne simule pas complètement l'impact des stress thermiques (gel sur épi ou échaudage thermique) sur les rendements ni sur la teneur en protéines, un préalable à l'analyse des résultats des simulations a été de déterminer une fenêtre de précocité à floraison permettant à la culture d'éviter ces stress. Considérant cette fenêtre de précocité, les simulations montrent que quel que soit le scénario climatique considéré, le rendement et le rendement en protéines augmenteraient avec le niveau de fertilisation azotée, que l'apport supplémentaire d'azote soit réalisé de manière classique (CL) ou en apport tardif (AT). Par contre, le fait de juste décaler les apports permettrait, comme attendu, une augmentation de la concentration en protéines mais qui se fait au détriment du rendement global, à fortiori pour les traitements où l'azote est le plus

limitant ainsi que pour les géotypes tardifs. Des simulations complémentaires où nous avons fait varier la teneur en CO₂ atmosphérique en maintenant les autres paramètres climatiques constants indiquent que l'augmentation de rendement simulée dans le futur est très clairement due à cette augmentation de CO₂ dans l'atmosphère. Ces résultats sont très similaires à ceux obtenus dans le cadre du projet Climator (Bancal et Gate 2010) avec une méthodologie un peu différente (modèle CERES, une variété précoce (Soissons), une tardive (Arminda),...). La compensation possible des conditions thermique et hydrique défavorables par un effet CO₂ est déjà soulignée. Une méta-analyse des études conduites en faisant varier la concentration en CO₂ (370 - 570 ppm) montre un effet moyen de ~+15% sur le rendement du blé (Ainsworth et Long 2005). Dans nos simulations, la comparaison des scénarios menés dans des conditions similaires de CO₂ (REF - FP-A2) donne des résultats très proches (+14%).

Alors que les simulations prédisent une augmentation des rendements moyens pour les scénarios futurs, les rendements en protéines restent stables signifiant une baisse de la teneur en protéines des grains. Dans le futur lointain et le scénario A2, même à forte fertilisation azotée avec apport tardif, la concentration en protéines du grain

est en moyenne relativement faible (9%). Les différents scénarios climatiques ont peu d'impact sur la quantité d'azote absorbée en pré-floraison. En moyenne, les différences sont de l'ordre de 4-5 kgN ha⁻¹ entre les extrêmes. Les différences sont aussi très faibles entre scénarios pour la quantité d'azote absorbée en post-floraison. On remarque par contre une plus forte variabilité liée aux traitements azotés les plus forts.

Les impacts du changement climatique sur la concentration en protéines et sur l'absorption d'azote n'avaient pas été étudiés sur le blé tendre dans le cadre de l'ANR Climator (Bancal et Gate 2010). L'effet négatif sur la concentration en protéines via l'augmentation de rendement due à l'efficacité plus forte de la photosynthèse à forte concentration en CO₂ à déjà été rapporté dans des expérimentations (*e.g.* Hoky *et al* 2009). Mais plus récemment, il a été montré qu'il pourrait exister un effet direct d'inhibition de la concentration en CO₂ sur l'assimilation du nitrate par les plantes (Bloomet al 2010 ; 2014).

La dernière partie de l'analyse concerne la quantification des interactions entre la précocité à floraison, les traitements azotés et les scénarios climatiques. Les résultats présentés se focalisent sur l'absorption d'azote post-floraison. En moyenne sur

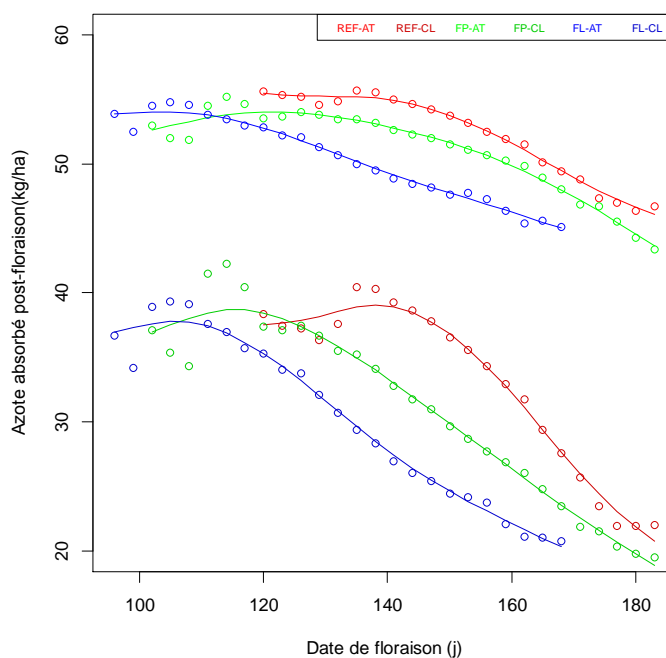


Figure 2 : Simulations de la quantité d'azote absorbé en post-floraison en fonction de la date de floraison (A) pour la période de référence (REF : 1961-1990), le futur proche (FP : 2021-2050) et le futur lointain (FL : 2071-2100) et pour les traitements azotés classiques (CL) et apport tardif (AT). Les valeurs représentent à chaque fois la moyenne des six lieux et la moyenne de trois traitements azotés et trois scénarios climatiques (B1, A1B, A2).

les six lieux, les interactions entre date de floraison et scénarios climatiques et surtout traitements azotés sont fortes. Globalement pour les différents scénarios climatiques, l'absorption post-floraison est stable puis diminue pour les géotypes les plus tardifs. Pour les traitements azotés classiques (CL), l'absorption post-floraison diminue assez fortement pour les géotypes tardifs, la majorité de l'azote étant absorbé en pré-floraison. Les traitements azotés tardifs (AT) permettaient de maintenir une absorption d'azote post-floraison sans risques accrues de mauvaises disponibilités pour les climats futurs par rapport au climat actuel (Figure 2).

Analyse de la dynamique d'absorption d'azote post-floraison en conditions contrôlées

Les objectifs principaux de l'expérimentation étaient de visualiser la dynamique d'absorption d'azote post-floraison, ainsi que de mesurer l'effet d'un niveau de nutrition azoté à floraison sur l'absorption en conditions azotées non-limitantes.

L'analyse des résultats de dosages d'absorption de nitrates par l'approche ^{15}N a permis d'établir que l'absorption d'azote n'était pas linéaire sur la phase post-floraison (Figure 3), révélant l'existence de mécanismes de régulation exercés par les plantes en conditions non-limitantes. Sur la base de ces résultats, deux types de régulations semblent intervenir dans le contrôle de l'absorption d'azote post-floraison.

Le premier niveau de régulation est lié à la demande exercée par la croissance des plantes induisant une augmentation des puits d'azote. Elle est commune aux quatre modalités azotées et permet de distinguer trois phases d'absorption sur la période post-floraison. La première phase, de Z65 à Z65+300DJ ou Z65+400DJ selon les modalités, est marquée par une diminution de l'absorption qui coïncide avec une faible croissance et donc une réduction de la force de puits. En effet, à ce stade, les organes photosynthétiques ainsi que l'épi sont pleinement établis et les grains sont dans une phase de croissance relativement lente. Cependant, l'élongation des tiges qui se poursuit quelques jours après floraison (Bertheloot *et al* 2012) peut expliquer une part d'absorption. La seconde phase est caractérisée par un arrêt d'absorption entre Z65+300DJ et Z65+400DJ selon les modalités, qui intervient à un stade de quasi absence de puits d'azote, le remplissage azoté des grains n'ayant pas

encore débuté. Enfin, la troisième phase est marquée par une reprise de l'absorption jusqu'à un stade proche de la maturité du grain sous l'effet de l'appel d'azote exercé par les grains en remplissage. En parallèle des régulations d'absorption d'azote exercées par la croissance de la plante, un second mécanisme de régulation de l'absorption d'azote est en évidence dans cette expérimentation est relatif au statut azoté à floraison. Dans nos conditions expérimentales, il intervient à floraison au moment du transfert des plantes dans des conditions azotées non-limitantes et se poursuit au cours de la première phase d'absorption décrite précédemment. Des différences marquées de niveaux d'absorption sont alors observées entre les modalités azotées (Figure 3). Plus les plantes sont carencées en azote à floraison, plus elles absorbent d'azote par unité de biomasse lors du passage en azote non-limitant.

L'analyse des résultats d'expression des gènes du réseau azote, portant sur deux modalités pré-floraison contrastées (4 mM et 10 mM), a mis en évidence la cohérence d'expression du réseau qui semble soumis à une régulation commune pour la réduction et l'assimilation de l'azote. Cependant, au niveau des transporteurs racinaires, les membres des deux grandes familles à basse (NRT1) et haute affinité (NRT2) semblent obéir à des mécanismes de régulation différents. En effet, leurs dynamiques d'expression ne sont pas corrélées, et seuls les NRT2 corréleraient avec les autres membres du réseau azote. La corrélation positive observée entre NRT2 et Nitratre Réductase (NR) pour les deux modalités testées suppose un rôle prépondérant de NRT2 dans l'absorption d'azote post-floraison.

Les résultats de dosages de nitrates racinaires (également effectués pour les modalités 4 mM et 10 mM) mettent en évidence des différences de concentrations en nitrates des racines à floraison en fonction du statut azoté. En effet, la modalité 4 mM, en état de carence azotée relative, a une teneur en nitrate racinaire très inférieure à la modalité 10 mM. Durant la première phase d'absorption, les teneurs en nitrates racinaires des plantes carencées augmentent rapidement et demeurent ensuite dans une gamme relativement comparable à celles des

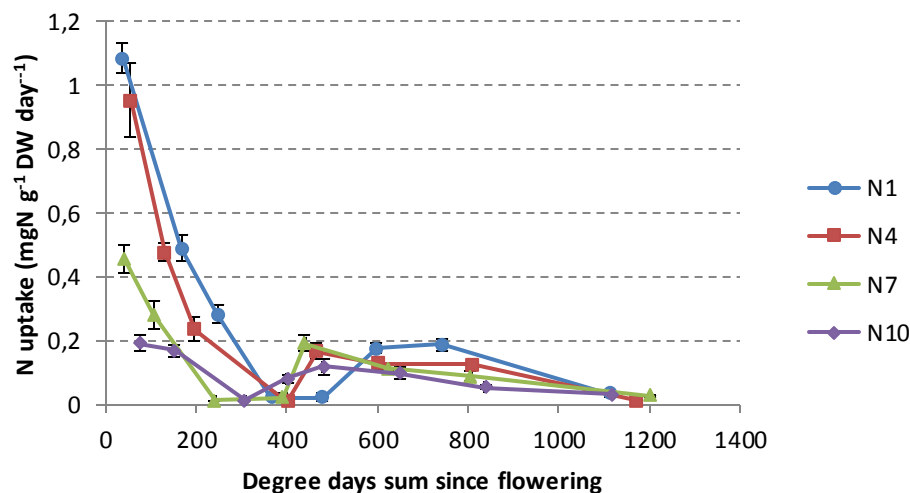


Figure 3 : Cinétique d'absorption d'azote post-floraison de la variété Récital cultivées en conditions contrôlées à quatre niveaux de fertilisation pré-floraison (1, 4, 7 et 10 mM).

plantes non carencées. Ces observations sont cohérentes avec les résultats de teneurs en azote des plantes entières. En revanche, une forte corrélation négative est observée entre la teneur en nitrate racinaire et l'expression de NRT2. Cette relation négative quelque peu contre-intuitive entre l'expression d'un transporteur racinaire et la concentration de son substrat dans le tissu laisse penser à une régulation du gène par le substrat. Selon cette hypothèse, le nitrate pourrait être un indicateur interne de l'état azoté de la plante. En absence de croissance, la demande azotée des parties aériennes est faible chez une plante non carencée et le nitrate s'accumulerait dans la racine, provoquant un ralentissement de l'absorption. À l'inverse, en situation de carence azotée, l'appel exercé par les parties aériennes diminuerait la teneur en nitrates racinaires et stimulerait de ce fait l'absorption.

Analyse de la variabilité génétique pour l'absorption post-floraison

Pour limiter de possibles biais liés à des différences de précocité et des apports d'azote réalisés à la même date (et non au même stade), l'objectif était d'expérimenter deux séries variétales homogènes présentant entre elles une large différence de date d'épiaison. Un écart moyen entre séries d'environ 10 jours a été obtenu. À l'intérieur de chaque groupe les écarts moyens entre le plus précoce et le plus tardif sont de 4-5 jours.

À l'intérieur de chaque groupe et pour chacun des deux traitements azotés et chacun des lieux, la corrélation entre la date d'épiaison et la quantité d'azote absorbé en post-floraison n'est pas

significative ($-0.43 < r < 0.36$, 3 essais x 2 traitements azotés x 2 séries). Restreindre l'étendue de variation de la date d'épiaison a donc bien permis de limiter ce biais potentiel.

La corrélation rendement – concentration en protéines a été calculée dans 52 conditions (13 essais x 2 traitements azotés x 2 séries). Comme attendu, toutes les corrélations sont négatives et 48/52 sont significatives au seuil de 5%. Le fait de travailler avec des séries très homogènes de précocité ne réduit donc pas la force de cette relation négative.

Les pentes et les coefficients de corrélation sont très proches entre les deux séries de précocité. La relation semble un peu plus forte à faible niveau d'azote que cela soit sur les moyennes des régressions ($r = -0.62$ en N+ et $r = -0.71$ en N-) ou sur la régression réalisée à partir des moyennes des rendements et concentration en protéines (Figure 4). Cela pourrait traduire un effet de dilution de l'azote par le carbone dans le grain plus fort en situation de carence en azote. En moyenne, la pente de la régression est proche de 0.1 (Figure 4) ce qui signifie qu'une augmentation du rendement de 10q ha⁻¹ se traduit par une baisse de 1 point de protéines. Cette valeur est très proche de celles déjà rapportées par Oury et Godin (2007) sur la base des données d'inscription et par Bogard et al. (2010).

Utilisation d'un marquage ¹⁵N pour estimer l'absorption post-floraison

Lors d'un précédent projet FSOV (2003), l'absorption post-floraison était significativement corrélée au GPD dans 9 essais sur 12 alors que la remobilisation de l'azote n'était jamais associée au GPD (Bogard et

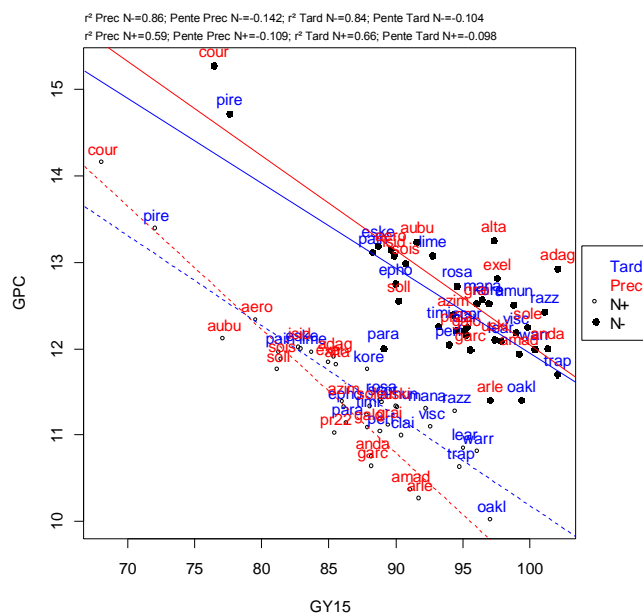


Figure 4 : Régression rendement (GY15, q ha⁻¹ à 15%) – concentration en protéines (GPC, %) pour la série précoce et la série tardive et les deux traitements azotés.

al 2010). Nous retrouvons globalement ce résultat avec 6 corrélations sur 12 significatives pour l'absorption post-floraison et aucune pour la remobilisation. En moyenne les corrélations GPD – absorption post-floraison sont très proches pour les séries tardives ou précoces ($r=0.48$ et $r=0.47$) et les traitements N+ ou N- ($r=0.46$ et $r=0.48$).

L'absorption d'azote pos-floraison reste difficile à estimer car elle nécessite des mesures de biomasse et de concentration en azote à floraison et maturité. L'utilisation d'azote marqué (isotope stable ¹⁵N) pourrait permettre une estimation plus facile. Pour tester cette méthode, 50 kg N ha⁻¹ marqués à 1% ont été appliqués soit à floraison, soit à floraison + 250°Cj, sur 10 variétés de la série précoce.

Environ 80% de l'azote apporté a été absorbé (83.5% pour l'apport floraison et 77.3% pour l'apport floraison + 250°Cj). Plus de 91% de cet azote se retrouve dans le grain à maturité, sans différence variétale significative. Cette valeur est identique à celle rapportée par Kichey *et al* (2007) qui par contre avait observé des différences variétales (de 90 à 93%).

La corrélation entre la quantité d'azote absorbé en post-floraison estimée par la différence de quantité d'azote à maturité et floraison et estimée par marquage ¹⁵N est forte ($r=0.79$, Figure 5). Elle est

supérieure à celle rapportée en moyenne par Kichey *et al* (2007) pour cinq variétés et deux traitements azotés ($r=0.40$ et $r=0.78$ pour deux années différentes). Cette différence peut sans doute s'expliquer en partie par la quantité d'azote marqué apportée dans chaque cas : 5 kg N ha⁻¹ pour Kichey *et al* (2007), 50 kg N ha⁻¹ dans notre cas. Cela s'explique par une quantité d'azote absorbé en post-floraison provenant de l'engrais marqué supérieure dans notre cas (environ 50 %) par rapport à l'étude précédente (environ 10%).

Les erreurs de mesures sont plus faibles pour la méthode utilisant le ¹⁵N par rapport à la méthode classique (CV=9.7% contre CV=27.6%). Enfin, la corrélation est significative entre l'estimation de l'absorption post-floraison par marquage ¹⁵N et le GPD ($r=0.41$).

Cet essai de marquage ¹⁵N est encourageant. Réalisé sur une seule expérimentation, il demande à être confirmé même si il est en accord avec des résultats précédents (Kichey *et al* 2007). Cette technique peut être une alternative intéressante à la méthode classique. Elle a déjà été employée à grande échelle sur le maïs pour quantifier la variabilité d'efficacité de remobilisation de l'azote (marquage au stade végétatif) de lignées recombinantes (Coque et

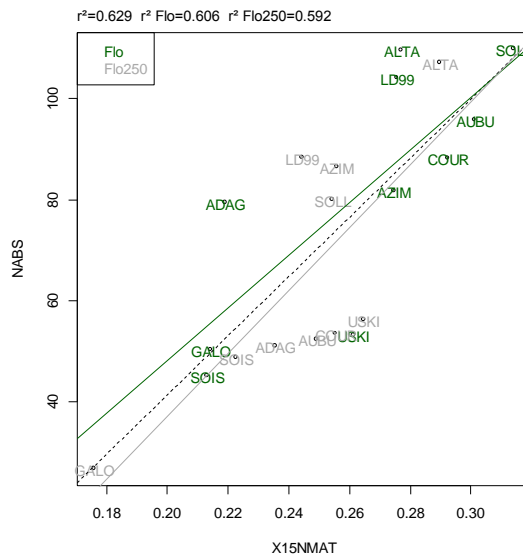


Figure 5 : Relation entre la quantité d'azote absorbé en post-floraison estimée par la différence de quantité d'azote en maturité et floraison (NABS, kg ha⁻¹) et estimée par marquage 15N (X15NMAT, g m²).

Gallais 2007). Son coût reste toutefois élevé même si elle permet d'économiser un prélèvement et un dosage d'azote à la floraison.

Déterminisme génétique de l'écart à la relation rendement – concentration en protéines

Ce volet a pour but d'analyser la variabilité génétique pour le GPD en utilisant un panel de génétique d'association. Cette approche requiert à la fois des données de phénotypage et des données de génotypage. Les données de phénotypage sont issues de ce projet et ont été obtenues sur la même collection de lignées que celle utilisée dans le projet

BreedWheat. Cela permettra d'accéder aux données de génotypage du projet BreedWheat pour réaliser la détection de régions impliquées par génétique d'association.

La régression rendement – concentration en protéines est toujours significativement négative quel que soit l'environnement. Les valeurs des coefficients de détermination s'étalent de 0.12 à 0.57. La moyenne des pentes égale à -0.072 est très proche de celle observée les années précédentes sur les groupes de lignées (Figure 4).

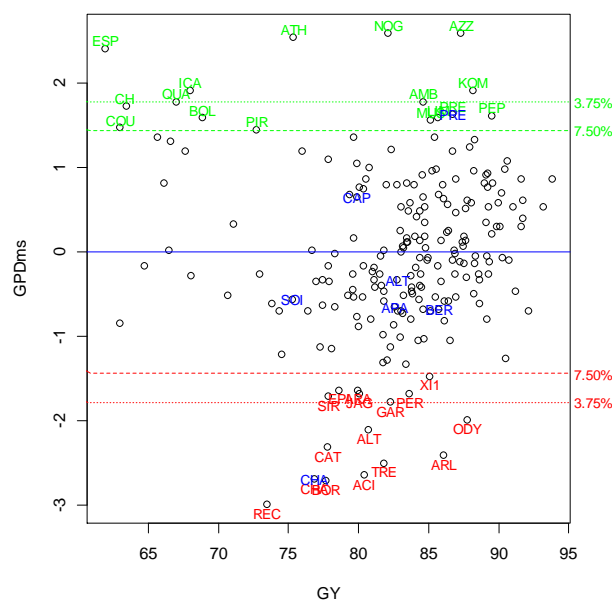
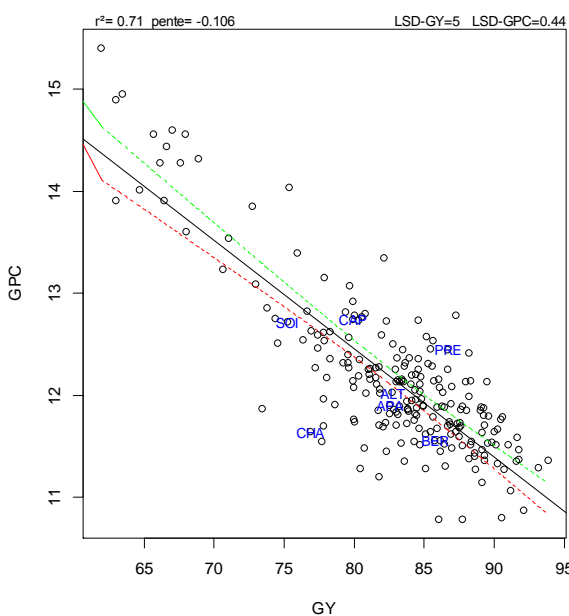


Figure 6 : (A) Régression rendement – concentrations en protéines sur les moyennes des 11 environnements. Les témoins sont en bleu. (B) GPD+ (vert) et GPD- (rouge) calculés sur la base de la régression précédente.

La régression moyenne est forte (Figure 6A), le fait de travailler sur les moyennes éliminant une partie des interactions génotype x milieu (Oury et Godin 2007). Si on applique les seuils statistiques utilisés lors de l'inscription sur les résidus standardisés (Figure 6B), 16 variétés sont déclarées GPD+ et 16 variétés GPD-. On retrouve les témoins Charger (GPD-) et Premio (GPD+) dont le comportement est déjà connu. A ces seuils statistiques correspondent un GPD de +/- 0.62 pour le bonus simple (seuil 7.50%) et de +/- 0.76 pour le bonus double (seuil 3.75%).

4. Conclusions

Ce projet a permis de confirmer plusieurs résultats concernant l'écart à la relation rendement –

concentration en protéines (GPD), (1) l'importance de l'absorption post-floraison et (2) la corrélation forte entre GPD mesurés dans différentes conditions, en utilisant des séries variétales de précocité homogène. Il a permis de montrer que les mêmes processus expliquent probablement le GPD calculé pour une même variété cultivée dans différentes conditions. Il a aussi permis de décrire finement la dynamique d'absorption post-floraison et de proposer un contrôle par le statut azoté de la plante et la demande en azote des organes en croissance. Il ouvre enfin des perspectives intéressantes en termes de phénotypage, avec l'utilisation d'un apport d'engrais marqué, et en terme de génétique en ayant produit un jeu de données qui pourra être utilisé pour réaliser une étude de génétique d'association.

Références bibliographiques

- Ainsworth, EA and SP Long 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy. *New Phytologist* 165: 351-371.
- Bancal, MO and P Gate 2010. Changement climatique et culture du blé : l'essentiel des impacts. In *Changement climatique, agriculture et forêt en France : simulation d'impacts sur les principales cultures*. Livre vert du projet Climator, eds. N Brisson and F Levrault, 155-168: ADEME.
- Bertheloot, J, B Andrieu and P Martre 2012. Light-nitrogen relationships within reproductive wheat canopy are modulated by plant modular organization *European Journal of Agronomy* 42: 11-21.
- Bloom, A J, M Burger, J S R Asensio and A B Cousins 2010. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. *Science* 328: 899-903.
- Bloom, AJ, M Burger, BA Kimball and PJ Pinter, Jr. 2014. Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. *Nature Climate Change* 4: 477-480.
- Bogard, M, V Allard, M Brancourt-Hulmel, E Heumez, J-M Machet, M-H Jeuffroy, P Gate, P Martre and J Le Gouis 2010. Deviation from the grain protein concentration – grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* 61: 4303-4312.
- Borrell, A K, G L Hammer and E Oosterom 2001. Stay-green: a consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? *Annals of Applied Biology* 138: 91-95.
- Coque, M and A Gallais 2007. Genetic variation for nitrogen remobilization and postsilking nitrogen uptake in maize recombinant inbred lines: Heritabilities and correlations among traits. *Crop Science* 47: 1787-1796.
- Fossati, D, A Fossati and B Feil 1993. Relationship between grain yield and grain nitrogen concentration in winter triticale. *Euphytica* 71: 115-123.
- Gate, P, A Blondlot, D Gouache, O Deudon and L Vignier 2008. Impacts of climate change on wheat growth in France. What solutions and actions to undertake? *Oléagineux Corps gras Lipides* 15: 332-336.
- Hogy, P, H Wieser, H Kohler, K Schwadorf, J Breuer, J Franzaring, R Muntifering and A Fangmeier 2009. Effects of elevated CO₂ on grain yield and quality of wheat: results from a 3-year free-air CO₂ enrichment experiment. *Plant Biology* 11: 60-69.
- Intergovernmental Panel on Climate Change 2007. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. In *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds. ML Parry, OF Canziani, JP Palutikof, PJ van der Linden and CE Hanson, 976: Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Kichey, T, B Hirel, E Heumez, F Dubois and J Le Gouis 2007. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlate with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* 102: 22-32.

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

Löffler, C M, T L Rauch and R H Busch 1985. Grain and plant protein relationships in hard red spring wheat. *Crop Science* 25: 521-524.

Lopez-Bellido, L, R J Lopez-Bellido and F J Lopez-Bellido 2006. Fertilizer nitrogen efficiency in durum wheat under rainfed Mediterranean conditions: Effect of split application. *Agronomy Journal* 98: 55-62.

Martre, P, J R Porter, P D Jamieson and E Triboï 2003. Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology* 133: 1959-1967.

Monaghan, J M, J W Snape, A J S Chojecki and P S Kettlewell 2001. The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high protein concentration and yield. *Euphytica* 122: 309-317.

Oury, F X and C Godin 2007. Yield and protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes. *Euphytica* 157: 45-57.

Oury, F-X, P Bérard, M Brancourt-Hulmel, C Depatureaux, G Doussinault, N Galic, A Giraud, E Heumez, C Lecomte, P Pluchard, B Rolland, M Rousset and M Trottet 2003. Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program. *Journal of Genetics and Breeding* 57: 59-68.

Sylvester-Bradley, R and D R Kindred 2009. Analysing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 60: 1939-1951.

Van Sanford, D A and C T MacKown 1986. Variation in nitrogen use efficiency among soft red winter wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 158-163.