

IMPACT DU STATUT AZOTE A FLORAISON SUR L'ABSORPTION D'AZOTE POST-FLORAISON CHEZ LE BLE TENDRE.

par François **Taulemesse**¹

RÉSUMÉ

Chez le blé tendre, la capacité de certaines variétés à concentrer beaucoup de protéines dans le grain malgré un bon niveau de rendement est liée à leur faculté accrue à absorber de l'azote après floraison, et ce malgré une absorption d'azote déjà importante avant floraison. L'objectif des travaux réalisés était de déterminer l'impact du niveau de nutrition azotée (aussi appelé statut azoté) à floraison sur l'absorption d'azote post-floraison, et de mieux comprendre les mécanismes de régulation impliqués. Une expérimentation conduite en conditions contrôlées a permis de mettre en évidence l'effet du statut azoté à floraison (Figure 1) sur l'absorption post-floraison précoce (Figure 2). A une échelle moléculaire, ces travaux suggèrent que le transporteur racinaire de nitrate *TaNRT2.1* joue un rôle majeur dans l'absorption post-floraison (Figure 3, Figure 4A) et que la concentration en nitrate des racines est un marqueur physiologique prometteur de l'état de satiété des plantes pour l'azote (Figure 4B).

IMPACT OF NITROGEN STATUS AT FLOWERING ON POST-FLOWERING NITROGEN UPTAKE IN BREAD WHEAT

ABSTRACT

*In bread wheat, the strong negative relationship between grain protein concentration (GPC) and grain yield (GY) makes it difficult to simultaneously improve both of these two central economic criteria. The deviation of some genotypes from the negative relationship (Grain Protein Deviation; GPD) however represents a promising alternative target for breeders. Although physiological bases of GPD are still poorly understood, variability for nitrogen (N) satiety during the post-flowering period is supposed to be at the basis of this phenomenon. The aim of this study was to understand the effects of plant N nutrition level (also called N status) at flowering on post-flowering N uptake (PANU), at physiological and molecular scales. Based on a semi-hydroponic system allowing a fine control of N availability, coupled with a ¹⁵N pulse labelling approach, this work allowed to demonstrate the strong influence of plant N status (Figure 1) on early PANU (i.e. occurring during the 250 degree-days following flowering ; Figure 2). The *TaNRT2.1* gene coding for a root nitrate transporter, whose expression dynamic in roots is closely related to that of major genes involved in N reduction and assimilation pathways (Figure 4A), is supposed to play a central role in PANU (Figure 3). The strong negative relationship between *TaNRT2.1* expression levels and root nitrate concentration (Figure 4B) suggests the existence of a negative control of nitrogen uptake by nitrate at the root level. Root nitrate concentration is thus proposed as a marker of plant N satiety.*

¹ INRA, UMR 1095 Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 5 chemin de Beaulieu, F-63100 Clermont-Ferrand, France

Université Blaise Pascal, UMR 1095 Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales, F-63178 Aubière Cedex, France

Arvalis-Institut du Végétal, Station Expérimentale de Boigneville, F-91720 Boigneville, France

✉ Coordonnées actuelles : Arvalis - Institut du végétal, Biopôle Clermont-Limagne, 63360 St-Beauzire
f.taulemesse@arvalisinstitutduvegetal.fr

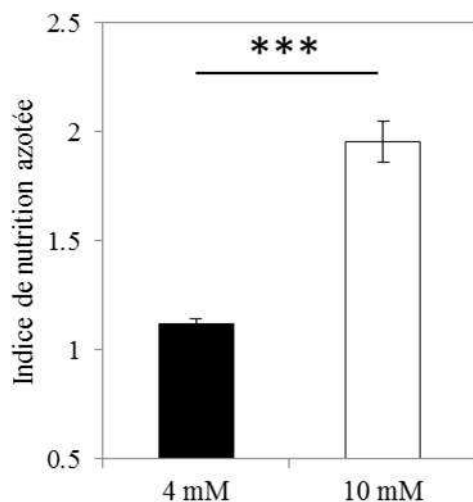


Figure 1 : Indice de nutrition azotée à floraison observé chez des plantes soumises à deux modalités azotées contrastées avant floraison. Cet indice est le quotient de la concentration en azote des parties aériennes des plantes divisée par une concentration en azote critique décrite par Justes *et al.* (1994) pour le blé. Il indique dans quelle mesure l'azote des plantes est limitant pour leur croissance en biomasse.

Figure 1: Nitrogen nutrition index at flowering observed on plants exposed to two contrasted nitrogen treatments before flowering. This index is the quotient of the aboveground plant N concentration divided by a critical N concentration described by Justes *et al.* (1994) for winter wheat. It indicates to what extent plant N is limiting for growth.

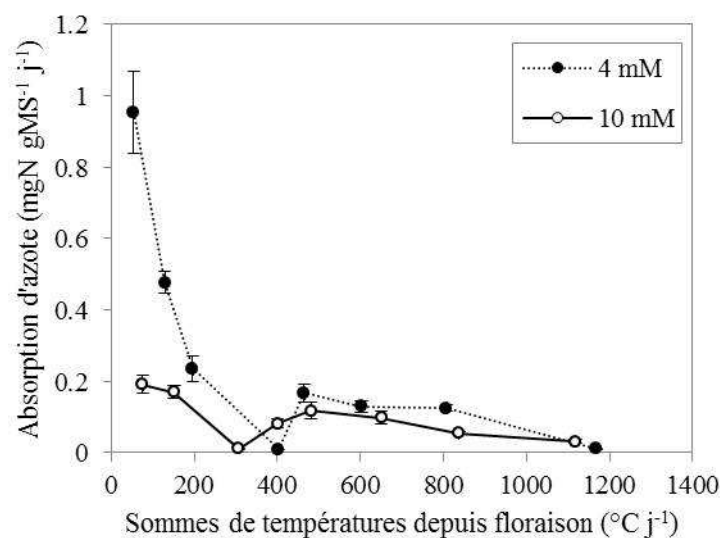


Figure 2 : Dynamiques de l'absorption d'azote au cours de la phase post-floraison en conditions non-limitantes pour l'azote chez des plantes présentant des statuts azotés contrastés à floraison.

Figure 2: Plant nitrogen uptake dynamic during post-flowering period under non-limiting nitrogen condition of plants exhibiting contrasted nitrogen status at flowering.

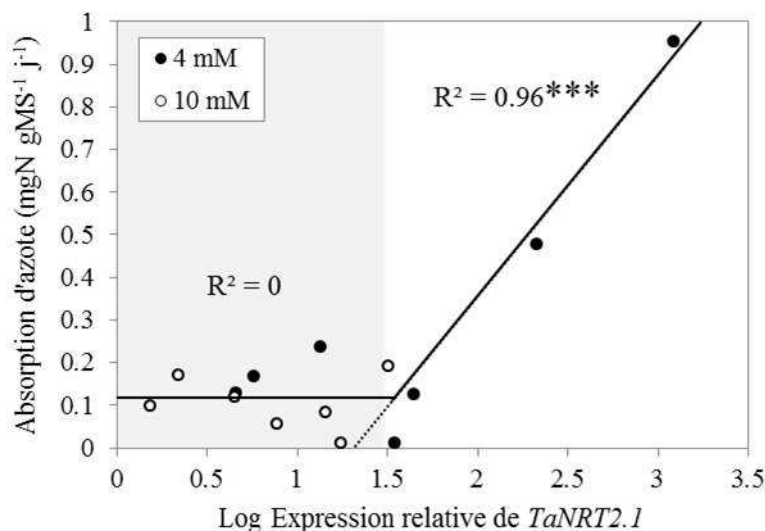


Figure 3 : Relation entre quantité d’azote absorbée sur 24 heures et expression du gène *TaNRT2.1* dans les racines au cours de la phase post-floraison. La relation présentée intègre huit dates de mesure chez des plantes soumises à deux modalités azotées contrastées (4 et 10 mM) au cours de la phase pré-floraison.

Figure 3: Relation between nitrogen uptake in 24 hours and TaNRT2.1 relative expression in roots during post-flowering period. This relation is demonstrated at eight sampling dates for plants exposed to two contrasted nitrogen treatments (4 and 10 mM) during the pre-flowering period.

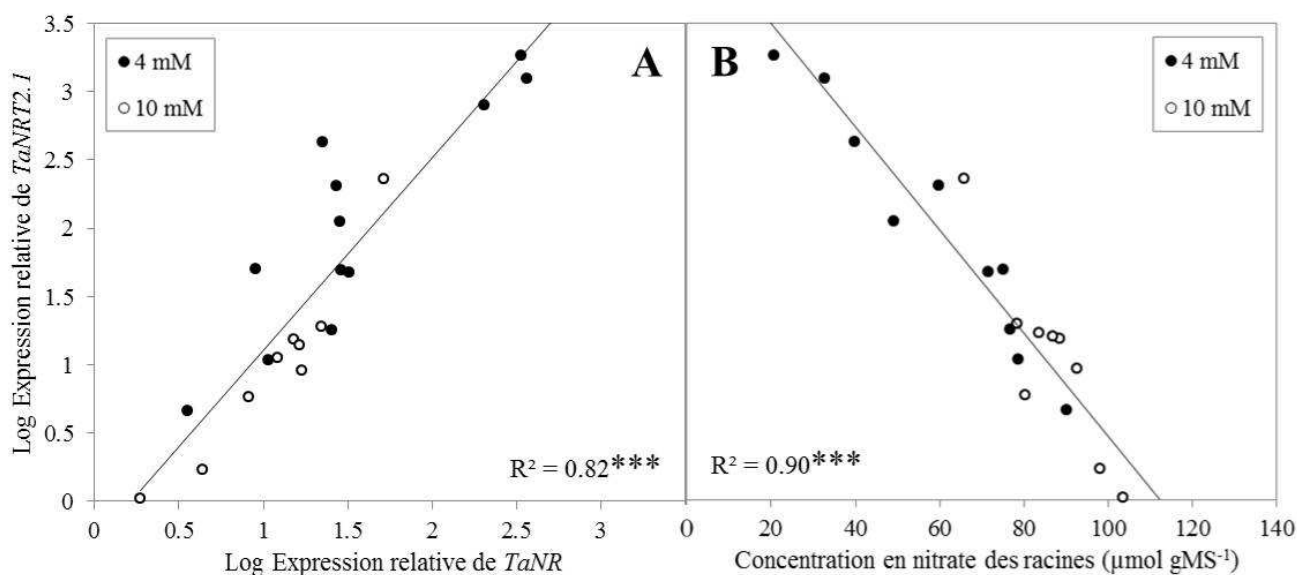


Figure 4 : Relations entre l’expression relative du gène *TaNRT2.1* dans les racines et l’expression relative du gène *TaNR* dans les racines (A) et entre l’expression du gène *TaNRT2.1* dans les racines et la concentration en nitrate des racines (B) au cours de la phase post-floraison précoce. Les relations présentées incluent les deux modalités azotées pré-floraison (4 et 10 mM).

Figure 4: Relations between TaNRT2.1 relative expression in roots and TaNR relative expression in roots (A) and between TaNRT2.1 relative expression in roots and root nitrate concentration (B) during the early post-flowering period. The given relations include the two pre-flowering nitrogen treatments (4 and 10 mM).

Introduction

La concentration en protéines des grains de blé est un critère qualitatif majeur qui conditionne la valeur économique et marchande de la récolte, pour la quasi-totalité des usages. En effet, la meunerie française, mais aussi les fabricants d'alimentation du bétail et les pays importateurs, souhaitent des grains avec une teneur en protéines élevée, souvent supérieure à 11.5%. Le marché export, très porteur pour la balance commerciale de la France, fait face à une concurrence de plus en plus forte y compris pour ses clients historiques comme ceux du pourtour méditerranéen. Pour rester compétitive, la France doit maintenir son volume de production tout en augmentant impérativement la concentration en protéines, dans un contexte de production sous des contraintes à la fois climatiques et réglementaires. Un tel contexte et le constat d'une érosion de la concentration en protéines depuis une quinzaine d'années ont conduit les acteurs de la filière céréalière à mettre en place un « plan national protéine ». L'identification de voies de progrès favorisant la concentration en protéines sans perdre en productivité est aujourd'hui nécessaire.

Parmi les leviers à mobiliser, l'amélioration génétique des variétés est un axe à privilégier. Cependant, la forte relation négative existant entre la concentration en protéines et le rendement (Simmonds, 1995 ; Feil, 1997) rend complexe l'amélioration simultanée de ces deux traits, et constitue un obstacle majeur en amélioration variétale pour répondre à la fois aux attentes sociales en termes de volume de production et aux attentes qualitatives des industriels. Néanmoins, pour des niveaux de rendement comparables, certaines variétés concentrent plus ou moins de protéines : la déviation robuste de certains génotypes vis-à-vis de cette relation négative (déviation appelée Grain Protein Deviation, GPD) suggère que le levier génétique pourrait permettre d'améliorer la concentration en protéines sans impacter négativement le rendement (Monaghan *et al.*, 2001). A une échelle physiologique, la GPD est associée à la capacité à absorber de l'azote au cours de la phase post-floraison indépendamment de la quantité d'azote absorbée à floraison (Bogard *et al.*, 2010), suggérant qu'une variabilité génétique de satiété pour l'azote pourrait être à la base de la variabilité de ce caractère.

Les avancées remarquables des connaissances des mécanismes régissant l'absorption et l'assimilation de l'azote à l'échelle moléculaire chez les espèces modèles (Miller *et al.*, 2007; Glass, 2009; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010) ouvrent aujourd'hui des pistes de recherche prometteuses pour les espèces d'intérêt agronomique comme le blé. La combinaison d'approches physiologiques et moléculaires se positionne ainsi comme une alternative intéressante pour comprendre et valoriser la variabilité génétique associée à des caractères complexes tels que la GPD.

L'objectif des travaux de cette thèse était de déterminer les effets du statut azoté sur l'absorption d'azote post-floraison, afin de préciser la portée de la notion de satiété pour l'azote sur la capacité à absorber après floraison et d'en déterminer les mécanismes de régulation. Pour cela, des approches physiologiques, moléculaires, ainsi que des mesures fines d'absorption d'azote par marquages ¹⁵N courts ont été réalisées en cinétique durant la phase post-floraison sur des plantes présentant des statuts azotés contrastés à floraison.

A. Matériel végétal et conditions de culture

L'étude s'appuie sur une expérimentation réalisée en conditions contrôlées, mettant en œuvre un système de culture semi-hydroponique permettant de contrôler finement la quantité d'azote disponible dans la solution nutritive. Cette expérimentation, réalisée sur la variété de blé tendre Récital, a consisté en l'application de deux modalités azotées contrastées (4 mM versus 10 mM de nitrate dans la solution nutritive) au cours de la phase végétative afin d'obtenir des plantes aux statuts azotés contrastés à floraison. A partir du stade floraison, et pour toute la durée de la phase reproductive, toutes les plantes ont ensuite été placées dans des conditions non-limitantes pour la nutrition azotée (10 mM) afin d'observer l'effet du statut azoté à floraison sur la capacité des plantes à absorber de l'azote après floraison.

Le statut azoté des plantes est une notion relative à leur état de nutrition azotée, qui intègre la quantité d'azote absorbée corrigée des effets du développement. Celui-ci permet de statuer sur le caractère limitant de l'azote des plantes pour leur croissance en biomasse. Dans cette étude, le statut azoté des plantes a été estimé avec l'indice de nutrition azoté, qui est le quotient de la concentration en azote des parties aériennes des

plantes divisée par une concentration en azote critique. Cette concentration en azote critique correspond à la concentration en azote minimale nécessaire à une croissance en biomasse maximale (Lemaire et Gastal, 1997), calculée selon l'équation proposée par Justes *et al.* (1994) pour les céréales.

B. Stades de prélèvement et mesures réalisées

Huit prélèvements ont été réalisés en cinétique au cours de la phase post-floraison, afin d'obtenir une vision intégrée de l'absorption d'azote au cours de cette phase et de ses répercussions physiologiques. Les points de mesure étaient positionnés environ tous les 150 degrés-jours (somme de température base zéro ; °C j⁻¹) de floraison à maturité.

Trois catégories de mesures ont été réalisées dans cette étude : des mesures physiologiques, des mesures fines d'absorption d'azote par marquage courts ¹⁵N, et des mesures moléculaires.

Les mesures physiologiques étaient des mesures de biomasse et de concentration en azote des différents organes des plantes. Les compartiments de racines, tiges, feuilles sèches, feuilles vertes, glumes/rachis et grains ont ainsi été observés indépendamment. Ces mesures ont, entre autres, permis de calculer l'indice de nutrition azoté à floraison.

Les mesures fines d'absorption par marquages ¹⁵N ont consisté à exposer des plantes à une solution nutritive enrichie à hauteur de 10% avec l'isotope radioactif stable ¹⁵N durant les 24 heures précédant chaque prélèvement. La quantité totale d'azote absorbée au cours de ces 24 heures a été fonction de la quantité d'azote marqué retrouvée dans les plantes.

Les mesures moléculaires consistaient à quantifier l'expression de gènes clés du métabolisme azoté par réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qRT-PCR). Pour cela, des amorces permettant une amplification spécifique des gènes cibles ont été dessinées. L'abondance des principaux ions et métabolites liés à l'azote que les techniques actuelles permettent de doser a également été quantifiée. Ces mesures moléculaires ont été réalisées séparément dans quatre compartiments (racines, tiges, feuilles vertes et épis).

C. Effet du statut azoté sur l'absorption d'azote post-floraison

Les deux modalités azotées appliquées avant floraison (4 mM ou 10 mM de nitrate) ont permis d'obtenir des plantes présentant des statuts azotés contrastés à floraison, comme l'indiquent les indices de nutrition azotée présentés en Figure 1. Ce premier résultat confirme que les conditions de culture mises en œuvre étaient adaptées aux objectifs de l'étude.

Les cinétiques fines d'absorption d'azote post-floraison, obtenues en conditions non-limitantes chez des plantes présentant des états de nutrition azotés contrastés à floraison (Figure 2), mettent en évidence la dynamique élaborée de l'absorption post-floraison. Ces résultats montrent que l'absorption d'azote post-floraison se déroule en trois phases distinctes : une première phase marquée par une réduction progressive de l'absorption entre floraison et floraison+300 à 400 °C j⁻¹, une deuxième phase marquée par un arrêt temporaire de l'absorption, et une troisième marquée par une reprise de l'absorption jusqu'à un stade proche de la maturité physiologique. Ces trois phases d'absorption de l'azote coïncident avec des évolutions physiologiques liées au développement des plantes : au cours des deux premières phases, peu d'organes sont en croissance et la demande pour l'azote est potentiellement réduite tandis que la troisième phase coïncide avec le remplissage du grain en azote au cours duquel la demande pour l'azote est forte. Cette observation suggère que la dynamique d'absorption d'azote soit rythmée dans ses grandes lignes par la demande en azote liée à la croissance.

L'influence du statut azoté à floraison sur l'absorption d'azote post-floraison est marquée au cours de la première phase, mais n'impacte plus l'absorption par la suite (Figure 2). Au cours de cette phase post-floraison précoce, les plantes présentant un statut azoté déficitaire à floraison (4 mM) absorbent beaucoup plus d'azote que les plantes bien pourvues (10 mM). Ces résultats corroborent l'hypothèse d'un contrôle de l'absorption post-floraison par la satiété en azote, et précisent que ce contrôle intervient précocement.

D. Acteurs moléculaires de l'absorption post-floraison

A une échelle moléculaire, l'expression du gène *TaNRT2.1*, codant pour un transporteur racinaire de nitrate à haute affinité, explique une grande part de l'absorption lorsque celle-ci intervient à un rythme soutenu (Figure 3).

Ces rythmes d'absorption soutenus interviennent uniquement au cours de la phase post-floraison précoce chez les plantes présentant un statut azoté déficitaire à floraison (Figure 2). Cela suggère que le gène *TaNRT2.1* soit un acteur majeur de l'absorption d'azote liée à la satiété pour l'azote.

L'hypothèse d'une implication forte du gène *TaNRT2.1* dans l'absorption post-floraison précoce est corroborée par la relation positive entre son expression et celle du gène codant pour la nitrate réductase (*TaNr*) (Figure 4A), premier acteur de la chaîne d'assimilation du nitrate chez les plantes. Des relations positives ont par ailleurs également été observées entre les expressions de *TaNRT2.1* et celles d'autres gènes majeurs du réseau de réduction et d'assimilation d'azote (Taulemesse *et al.*, 2015, Taulemesse *et al.*, 2016). La relation négative observée entre l'expression de *TaNRT2.1* et la concentration en nitrate des racines (Figure 4B) est une indication précieuse pour la compréhension des mécanismes de régulation de l'absorption post-floraison précoce. L'hypothèse proposée est que le nitrate racinaire soit un indicateur de l'état de satiété de la plante pour l'azote : une accumulation de nitrate dans les racines signifierait que l'absorption de nitrate intervienne à un rythme plus soutenu que son utilisation par la plante ; son accumulation dans les racines réprimerait ainsi le transporteur pour éviter une absorption inutile et coûteuse en énergie. Sur cette base, la concentration en nitrate des racines est proposée comme marqueur physiologique de l'état de satiété des plantes, conditionnant leur capacité à absorber de l'azote au cours de la phase post-floraison précoce. Par ce biais, la concentration en nitrate des racines apparaît comme un indicateur possible du caractère GPD des variétés.

Conclusions

Cette étude a permis de démontrer l'impact du statut azoté sur l'absorption post-floraison, et de préciser les phénomènes moléculaires impliqués dans sa régulation. Cette connaissance de la régulation de l'absorption d'azote par la satiété en azote constitue un outil précieux dans la recherche des déterminismes de la variabilité génétique associés au GPD. Plus récemment, la découverte de l'existence d'une variabilité génétique de la satiété pour l'azote à statut azoté équivalent chez des génotypes contrastés pour la GPD (Taulemesse *et al.*, 2016), impliquant les mécanismes proposés dans la présente étude, confirme le potentiel prometteur de la concentration en nitrate des racines comme marqueur physiologique du GPD.

Remerciements : Ce travail a été financé par le projet « Fonds de Soutien à l'Obtention Variétale » (FSOV) 2010F (2011-2013), et la thèse CIFRE ARVALIS Institut du végétal - INRA durant laquelle les travaux ont été effectués a été subventionnée par l'« Association Nationale de la Recherche et de la Technologie » (ANRT).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) BOGARD M., ALLARD V., BRANCOURT-HULMEL M., HEUMEZ E., MACHET J.-M., JEUFFROY M.-H., *et al.*, 2010. – Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *J Exp Bot.* **61**, 4303–4312.
- (2) FEIL B., 1997 – The inverse yield-protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends Agron.* **1**, 103–119.
- (3) GLASS ADM., 2009 - Nitrate uptake by plant roots. *Botany.* **87**, 659–667.

- (4) JUSTES E., MARY B., MEYNARD JM., MACHET JM., THELIER-HUCHE L, 1994. - Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany*. 74: 397–407.
- (5) LEMAIRE G., GASTAL F., 1997. – N uptake and distribution in plant canopies. Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 3–43.
- (6) MASCLAUX-DAUBRESSE C., DANIEL-VEDELE F., DECHORGNAT J., CHARDON F., GAUFICHON L., SUZUKI A., 2010. – Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141–1157.
- (7) MILLER A-J., FAN X., ORSEL M., SMITH S-J., WELLS D-M., 2007. – Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*. **58**, 2297–2306.
- (8) MONAGHAN J-M., SNAPE J-W., CHOJECKI A-J-S., KETTLEWELL P-S., 2001. – The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica*. **122**, 309–317.
- (9) SIMMONDS N-W., 1995. – The relation between yield and protein in cereal grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **67**, 309–315.
- (10) TAULEMESSE F., 2015. – Analyse écophysiological et génétique de l'absorption d'azote post-floraison chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) en relation avec la concentration en protéines des grains. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II. 181 p.
- (11) TAULEMESSE F., LE GOUIS J., GOUACHE D., GIBON Y., ALLARD V., 2015. – Post-flowering nitrate uptake in wheat is controlled by N status at flowering, with a putative major role of root nitrate transporter NRT2. 1. *PloS one*, **10(3)**, e0120291.
- (12) TAULEMESSE F., LE GOUIS J., GOUACHE D., GIBON Y., ALLARD V., 2016. – Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grain Protein Concentration Is Related to Early Post-Flowering Nitrate Uptake under Putative Control of Plant Satiety Level. *PloS one*, **11(2)**, e0149668.