



UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE

Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie

Thèse présentée par

Julie GOMBERT

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Caen

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions
(Arrêté du 7 août 2006)

**Efficienc e d'utilisation de l'azote par le colza d'hiver
(*Brassica napus* L.) : effet de la fertilisation azotée et
variabilité génotypique**

Soutenue à Caen le **11 décembre 2006**, devant la commission d'examen composée de :

C. SALON, Directeur de Recherche, INRA Dijon	Rapporteur
P. LETERME, Professeur, ENSA Rennes	Rapporteur
A. BOUCHEREAU, Professeur, Université de Rennes 1	Examineur
X. PINOCHET, Ingénieur, CETIOM	Examineur
B. NEY, Professeur, INA Paris-Grignon	Examineur
A. OURRY, Professeur, Université de Caen	Examineur
F. LE DILY, Professeur, Université de Caen	Directeur de thèse

Remerciements

Au terme de ce travail, j'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont donné goût à la recherche et qui m'ont encouragée au cours de mes études; la liste risque d'être longue!!!

Tout d'abord, je tiens à remercier le directeur du laboratoire, Alain Ourry, pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA nutrition NCS pour la réalisation de mon stage de DEA puis pour ma thèse.

J'aimerais adresser mes remerciements les plus sincères à mes co-directeurs de thèse, Frédéric Le Dily et Alain Ourry. Merci à tous les deux de m'avoir encadrée au cours de ces trois années. Vous avez su me laisser beaucoup de liberté et d'autonomie pour gérer mon projet de thèse, tout en étant disponibles aux moments où j'en avais besoin et ce, malgré vos emplois du temps surchargés!

Fred, je te remercie pour ta bonne humeur continue, pour avoir toujours été optimiste par rapport à mon travail, pour m'avoir accompagnée à toutes les manifestations liées au colza, pour ta participation joyeuse à la manip champ et pour avoir dépensé beaucoup de temps et d'énergie sur le plan administratif (rapports région, tutorat...)! Encore merci pour tout!

Alain, je te remercie pour ton aide et tes idées pertinentes sur les flux d'azote et sur l'ensemble de mon travail, pour tes corrections rapides et attentives, et aussi pour tes anecdotes équestres le midi au RU ainsi que pour le hennissement de ta jument nous signalant que tu as reçu un email (c'est nettement plus agréable que le cri 'strident' précédent!!!).

Je suis très honorée que Christophe Salon et Philippe Leterme aient accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Bertrand Ney, Alain Bouchereau et Xavier Pinochet de l'intérêt qu'ils portent à mon travail en acceptant d'en être les examinateurs.

Je remercie Xavier Pinochet pour son soutien et l'intérêt qu'il a porté à mon travail tout au long de ces trois années, ainsi que pour son appui sur l'obtention du co-financement du CETIOM.

J'en profite pour remercier également Bertrand Ney de m'avoir permis de suivre le DEA APC de l'INA-PG et je lance un petit clin d'œil à la promo 2003 dont beaucoup terminent leur thèse ces mois-ci!!! Bon courage à tous et bonne continuation! Delphine, merci pour ton soutien au cours de ces trois années, je pense fort à toi pour les mois prochains, courage et à bientôt!

Je tiens à remercier mes deux co-financeurs sans qui je n'aurais pas pu accomplir ce travail: le CETIOM et le Conseil Régional de Basse-Normandie. Je remercie également Promosol pour le soutien financier des coûts de fonctionnement liés à mon travail de thèse.

J'aimerais également remercier l'équipe d'Hervé Vaucheret (laboratoire de biologie cellulaire, INRA Versailles) qui m'a accueillie lors de mon stage de maîtrise en 2002. Cette première expérience en laboratoire de recherche m'a convaincue de poursuivre mes études de biologie végétale dans la recherche et j'en suis ravie! Donc, merci à Florence, Sandrine, Valérie, Christophe et Hervé pour leur accueil et leur dynamisme au cours de ces quatre mois.

Attention, j'adresse maintenant une montagne de remerciements aux personnes qui ont participé aux 'expéditions Grignon'!!!

Merci à tous pour votre aide, votre bonne humeur, votre motivation durant ces nombreuses semaines, réalisant tous les jeudis un aller-retour Caen-Grignon en partant à 7H et rentrant souvent après 22H... Mon travail de thèse n'aurait pu être réalisé sans votre aide, ce fut un réel travail d'équipe, toujours dans la bonne humeur et ce, malgré la fatigue, la pluie, la chaleur... j'en garde un excellent souvenir, encore merci à vous tous.

L'expédition Grignon 2004: je remercie Dominique (roi du carottage quelle que soit la saison), Patrick (roi du comptage de cicatrices), Michèle (reine des pesées), Alex (princesse des alu), Fred (roi des blagues) et Frédo (le dépanneur de juillet). Je remercie profondément Christine pour avoir assuré brillamment la logistique liée à ces nombreux déplacements ainsi que Marie-Paule pour l'analyse IRMS des 'quelques' milliers d'échantillons...

L'expédition Grignon 2005: je remercie Alex, Lucie, Jean-Christophe Avice et Philippe Etienne car bien que la fréquence des expéditions était moins élevée, l'intensité était assez 'monstrueuse'! Souvenez-vous des nocturnes jusqu'à 2-3h du mat, le réveil à 7h et rebelote pour boucler le tout sur 2 jours, toujours dans la bonne humeur!

Philippe, je te remercie d'avoir toujours gardé un œil sur mon travail depuis le DEA, même si tu trouvais les flux d'azote moins attrayants que la BM!!! Merci pour ton aide en BM et ta contribution pour les différentes publications.

Je remercie également l'ensemble de l'UMR ECG Grignon pour son accueil chaleureux lors de mes nombreux déplacements.

Dans le cadre du projet Promosol Azote Colza, je remercie Julie, Manu, Alexandre, Alexandra et Jean-Michel pour l'excellent souvenir que je garde de cette collaboration, aussi bien sur le plan pratique lors des récoltes sur le terrain, que dans l'exploitation et l'analyse des résultats. Un gros merci car une grande partie de mon travail de thèse repose sur cette expérimentation! Je remercie également Alexandra Jullien et Jean-Michel Allirand pour leur soutien et leurs relectures attentives des publications.

Je remercie les personnes présentes à chaque réunion de travail en Septembre pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci à Philippe Lainé, Mr Billard, Philippe E, Fred et Alain.

Je souhaite également remercier Josette et Patrick pour m'avoir transmis leurs 'secrets' concernant l'extraction et la séparation des protéines...

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont apporté une aide statistique pour l'exploitation de mes données. Je remercie donc Y. Lehuede pour son suivi depuis la formation STAT avant son départ à Mayotte. Merci d'avoir toujours répondu avec beaucoup d'intérêt à mes envois de données par email!! Je remercie également J.Lejeune pour son aide et ses conseils de lecture. Enfin, je remercie Servane Lemauiel-Lavenant pour son aide pratique indispensable sur Minitab. Servane, je te remercie également de m'avoir donné l'opportunité de dispenser quelques cours à l'IUFM, cela me tenait beaucoup à cœur, alors un gros merci pour cette expérience!

Je remercie Laurence Rossato pour son encadrement au cours des premiers mois de ma thèse et en particulier pour son aide dans la préparation pratique de la manip champ. Et ensuite, merci pour ton soutien tout au long de ma thèse depuis l'autre côté du globe ainsi que pour ta relecture attentive de la publication.

Je tiens à remercier les étudiants-stagiaires: Boris, Aurélie, Lucie, Emilie, Anne-Sophie, Hubert et Nicolas, pour leur aide enthousiaste et dynamique au cours de ma thèse. Bonne continuation à tous!

Une petite pensée pour les thésards et étudiants croisés au laboratoire: Florence, Véronique, Philippe, Carine (que je remercie très fort pour son soutien depuis de le DEA), Isabelle, Frédo, Nicolas, Bertrand, Fabien, Stéphanie, Tiphaine, Ange-Laure, Deborah, Dje, Seb, Marie, Laure, Virginie, Carole, Lucie, Benjamin, Echarki et Maha. Bonne continuation à tous et courage aux thésards!

Bienvenue aux DEA: Anne-Sophie, Charlotte, Tinou, Nicolas et Alexandre!

Merci à tous pour les sorties bowling, la balade à cheval sur la plage, les restos, les soirées uno..., que de bons souvenirs!!! Merci en particulier à Frédo et Séverine pour les soirées barbecue et autres, toujours bien sympathiques.

Merci à Bertrand pour nos encouragements mutuels pendant la phase de rédaction. Le plus dur est fait, on y est presque!!! Bon post-doc aux USA, c'est super!

Je remercie également mes voisins de bureau: Philippe et Tae Hwan, lorsque je suis arrivée en DEA puis Seb et Bok-rye. Merci pour votre sympathie et d'avoir supporté l'odeur de mes échantillons secs de colza s'échappant des armoires...

Je remercie chaleureusement l'ensemble du laboratoire pour l'excellente ambiance qui y règne grâce à la bonne humeur de chacun! Merci à vous tous car c'est bien agréable de travailler dans une telle atmosphère.

Laurent, Damien, Bertrand et Djé, je garde un très bon souvenir des cours de golf avec Maurice et des parcours le samedi matin toujours très vivifiants et chantants (la forêt, la forêt, la forêt...).

Je remercie les membres du saucisson-bière du vendredi soir, c'est un moment bien agréable, surtout très drôle, bref excellent pour finir la semaine!!

Je tiens à saluer Christine pour son travail et son investissement pour chaque membre du laboratoire. Christine, un gros merci pour ton soutien, ta disponibilité, ton écoute, ton aide ainsi que pour les merveilleux fruits de ton jardin que tu nous fais déguster (surtout les cerises!!!).

J'aimerais remercier tout spécialement Alexandra. Alex, le 1^{er} Octobre 2003, on arrivait toutes les deux au labo et aujourd'hui, nos contrats se terminent ensemble (sniff!). Un énorme merci pour ton aide au cours de ma thèse, en particulier pour les 2 expéditions Grignon!!! Merci pour ton soutien, pour le thé à 16H, pour ta bonne humeur, pour nos balades à cheval... J'espère que nos routes professionnelles se recroiseront car ce fût un plaisir de bosser avec toi. Sur le plan équestre, c'est une évidence: vivement nos prochaines escapades à cheval, First t'attend!

Merci à mes proches qui m'ont encouragée durant mes études.

En particulier, je remercie mes 3 amies de toujours Mariane, Julie et Elodie, pour leur soutien et pour tous les bons moments passés ensemble au cours de ces 3 années!

Jérémy, merci pour ton soutien, ta patience, ton aide au cours de ces derniers mois et merci, surtout, pour tout le reste... (merci à la sfbv,☺)

Je remercie profondément mes parents pour leur soutien «téléphonique et emailique» depuis le Maroc et Mayotte au cours de la thèse, mais également pour m'avoir toujours encouragée à poursuivre des études qui me plaisaient. Je remercie également affectueusement mon frère, Célestin, et Christèle pour leur soutien et leur accueil toujours chaleureux le weekend.

Pour finir, je souhaiterais remercier tout spécialement ma grand-mère pour l'intérêt qu'elle a porté au colza depuis quelques années (...) et surtout, pour son soutien quotidien inébranlable!!! Ma chère Jacqueline, un gros merci pour tout!

Abréviations

ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomal
ATP	Adénosine TriPhosphate
°CJ	degrés-jour
CETIOM	CEntre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains
CHATS	Constitutive High Affinity Transport System
Chl	Chlorophylle
CLATS	Constitutive Low Affinity Transport System
Da	Dalton
DW	Dry Weight
EUA	Efficiency d'Utilisation de l'Azote
FR	Far Red
GABA	Acide α -Amino Butyrique
ha	hectare
HATS	High Affinity Transport System
IHATS	Inducible high Affinity Transport System
ILATS	Inducible Low Affinity Transport System
IRN	Indice de Récolte en azote
Km	constante apparente d'affinité
LAID	Leaf Area Index Duration
LAI	Leaf Area Index
LATS	Low Affinity Transport System
LR	Leaf Rank
MF	Matière Fraîche
MS	Matière Sèche
N	Nitrogen
¹⁵N	isotope stable de l'azote
NHI	Nitrogen Harvest Index
NO₃⁻	nitrate
NRT	nitrate transporter
NUE	Nitrogen Use Efficiency
NU_pE	Nitrogen Uptake Efficiency
NU_tE	Nitrogen Utilization Efficiency
PAR	Photosynthetically Active Radiations
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSII	PhotoSystème II
QN	quantité d'azote
R	Red
RCC	Red Chlorophyll Catabolite
RT	Reverse Transcriptase
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
SAG	Senescence-Associated Genes
SDS	Senescence Down-regulated Genes
VSP	Vegetative Storage Protein

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I. Analyse bibliographique	4
A La culture de colza	4
A.1 Grandes étapes dans l'amélioration du colza	4
A.2 Evolution des surfaces cultivées et de la production.....	4
A.3 Utilisations du colza	5
A.4 Cycle ontogénétique du colza d'hiver	6
A.5 Intérêts agronomiques du colza.....	7
A.5.1 Structure et fertilité du sol.....	7
A.5.2 Maladies et adventices	7
A.5.3 Lutte contre l'érosion, effet de serre et paysager	7
A.6 Elaboration du rendement	7
A.7 Indicateurs agronomiques de l'efficacité de la fertilisation azotée.....	8
A.8 Fertilisation azotée et bilan environnemental.....	10
B Absorption et Allocation de l'azote	11
B.1 Absorption de l'azote	11
B.1.1 Systèmes de transport impliqués.....	11
B.1.2 Régulation de l'absorption du nitrate.....	12
B.1.3 Cinétique d'accumulation de l'azote chez le colza au cours d'un cycle de culture 13	
B.2 Allocation de l'azote absorbé chez le colza	15
B.2.1 Depuis le semis jusqu'à la reprise de végétation.....	15
B.2.2 Depuis la reprise de végétation jusqu'à la maturité	15
C Mise en réserve et remobilisation de l'azote.....	16
C.1 Mise en réserve.....	16
C.1.1 Rôle des réserves azotées	16
C.1.2 Nature des réserves azotées.....	16
C.1.3 Régulations de la mise en réserve	17
C.2 Remobilisation de l'azote.....	18
C.2.1 Importance quantitative.....	18
C.2.2 Contribution des différents organes au remplissage des graines.....	19
C.3 Sénescence foliaire et remobilisation.....	20
C.3.1 Définition et caractéristiques de la sénescence	20
C.3.2 Mécanismes de la sénescence	21
C.3.3 Régulation de la sénescence.....	25
D Conclusions et objectifs de recherche	27

Chapitre II. Nitrogen Dynamics in Field Grown Winter Oilseed Rape. I. Effect of Contrasted Nitrogen Fertilizations.	29
A Introduction.....	32
B Materials and methods	34
B.1 Experimental site.....	34
B.2 Experimental treatments, labelling and sampling	34
B.3 Chemical analysis and calculation of N fluxes	35
B.4 Indexes of N use efficiency.....	36
B.5 Statistical analysis	37
C Results.....	37
C.1 Dry matter production.....	37
C.2 N accumulation and mobilization	38
C.3 Loss of nitrogen by leaf fall	39
C.4 N Dynamics.....	40
C.5 N indexes.....	41
D Discussion	41
D.1 N Uptake	42
D.2 N Remobilization	43
D.3 Fallen leaves.....	44
D.4 Agronomic overview.....	44
Chapitre III. Nitrogen Dynamics in Field Grown Winter Oilseed Rape. II. Genotypic differences in interaction with N supply.	46
A Introduction.....	49
B Materials and methods	50
B.1 Experimental site and cultivars	50
B.2 Experimental treatments, labelling and sampling	51
B.3 Chemical analysis and calculation of N fluxes	52
B.4 Indexes of N use efficiency.....	53
B.5 Statistical analysis	53
C Results.....	54
C.1 Dry matter production.....	54
C.2 N accumulation and mobilization	54
C.3 Loss of nitrogen by leaf fall	56
C.4 N Dynamics.....	57
C.5 N indexes.....	58
D Discussion	59
D.1 N Uptake	59
D.2 N Remobilization	60
D.3 Fallen leaves.....	62
D.4 Agronomic overview.....	62

Chapitre IV. The expression patterns of *SAG12/Cab* genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to environment. 64

A	Introduction	67
B	Materials and methods	69
B.1	Plant culture.....	69
B.2	Experimental treatments and sampling	70
B.3	Nitrogen analysis.....	70
B.4	Chlorophyll Content.....	70
B.5	Soluble proteins extraction and quantification.....	70
B.6	RNA extraction	71
B.7	RT-PCR analysis	71
C	Results	72
C.1	Changes in fresh weight of leaves and roots.....	72
C.2	Changes in chlorophyll content in individual leaves	72
C.3	Changes in the amount of protein in individual leaves	72
C.4	Changes in expression of genes affected by leaf senescence.....	73
D	Discussion	74
D.1	Metabolic indicators of leaf senescence.....	74
D.2	Molecular indicators of leaf senescence.....	75

Chapitre V. Discussion..... 77

A	Améliorer l'efficience de l'azote.....	77
B	Complexité de l'efficience de l'azote.....	77
C	Efficience d'absorption de l'azote.....	78
C.1	Absorption totale	78
C.2	Profil d'absorption de l'azote au cours du développement	79
C.3	Allocation de l'azote absorbé.....	80
D	Efficience de remobilisation de l'azote.....	81
D.1	Remplissage en azote des siliques.....	81
D.2	Asynchronisme entre la remobilisation de l'azote des feuilles et la mise en place des siliques.....	82
D.3	Sénescence foliaire et remobilisation.....	84
E	Pistes pour l'amélioration variétale.....	85

Chapitre VI. Conclusions generales et perspectives de recherche	87
A Conclusions générales	87
A.1 Absorption et répartition de l'azote.....	87
A.2 Remobilisation de l'azote.....	87
A.3 Feuilles chutées	88
A.4 Indicateurs agronomiques de l'efficacité de la fertilisation azotée	88
A.5 Sénescence foliaire	89
B Perspectives de recherche.....	89
Chapitre VII. Valorisation des Compétences: un Nouveau Chapitre de la Thèse.....	93
Références bibliographiques	101

Introduction

Introduction générale

Le colza (*Brassica napus* L.) appartient à la famille des Brassicacées (crucifères) et résulte de l'hybridation naturelle entre le chou (*Brassica oleracea* L.) et la navette (*Brassica campestris* L.). Les variétés de colza d'hiver, les plus répandues en Europe de l'Ouest, sont considérées comme des plantes bisannuelles et réalisent leur cycle de développement en 250-310 jours. Les variétés de printemps, dont le cycle de développement s'effectue en 120-150 jours, sont considérées comme des plantes annuelles.

Le colza est une espèce de grande culture dont les surfaces cultivées ne cessent d'augmenter, dépassant actuellement 1,3 millions ha en France. L'intérêt croissant porté au colza s'explique par les débouchés multiples et variés qu'offre cette culture. Le colza, première espèce oléagineuse en France (devant le tournesol, le soja, la moutarde...), est cultivé pour la richesse de ses graines en lipides (environ 45% de la graine) et en protéines (environ 20% de la graine). L'extraction de l'huile alimentaire par pression fournit des tourteaux riches en protéines, utilisés pour l'alimentation animale. A cela s'ajoutent les possibilités d'utilisation industrielle comme le biocarburant (diester), les lubrifiants, les plastiques...

D'un point de vue agronomique, le colza présente une forte capacité d'absorption racinaire du nitrate qui en fait une culture « épuratrice » de l'excédent nitrique du sol, contribuant ainsi à une préservation de la qualité de l'eau des nappes phréatiques. De plus, l'enracinement profond du colza permet une bonne restructuration du sol. C'est pourquoi, dans un premier temps, l'objectif de l'implantation du colza lors de l'interculture était d'améliorer le rendement des cultures principales (céréales). Malgré une forte capacité d'absorption du nitrate, l'indice de récolte en azote (IRN) du colza est faible (environ 0,5-0,6), indiquant que la quantité d'azote retrouvée dans les graines est faible par rapport à celle absorbée par la plante au cours de son développement. Pour compenser la faible efficacité de transfert de l'azote des organes végétatifs vers les tissus reproducteurs, une fertilisation minérale élevée (180 kg N ha⁻¹) est apportée. Les conséquences principales sont d'ordre économique, liées à un surcoût de fertilisation azotée et d'ordre environnemental puisque l'azote non remobilisé vers les organes reproducteurs est en partie restitué au sol lors de la chute des feuilles (le retour au sol de l'azote par minéralisation des feuilles chutées pouvant atteindre 100 kg N.ha⁻¹; Desjoux *et al.*, 2000).

Afin d'améliorer le bilan environnemental du colza, les pratiques culturales consistent à diminuer le niveau de fertilisation azotée, potentiellement au détriment du rendement. L'emploi de variétés plus efficaces vis-à-vis de l'azote, c'est-à-dire présentant à la fois une forte efficacité d'absorption de l'azote (rapport de l'azote absorbé sur l'azote disponible) et une efficacité d'utilisation élevée de l'azote (rapport du rendement sur l'azote présent dans la plante à maturité) permettrait de limiter les retours d'azote vers l'environnement tout en préservant le rendement. Des recherches d'ordre plus fondamental, ont été entreprises dans le cadre de ce travail afin notamment d'identifier et de caractériser des indicateurs de la sénescence foliaire, susceptibles d'être ensuite utilisés pour comparer différents géotypes.

Dans un tel contexte, la recherche développée dans le cadre de ce travail de thèse visait à caractériser des variétés de colza afin de déterminer s'il existe une variabilité génétique (potentiellement exploitable en sélection) pour l'efficacité de l'azote. Pour cela, des variétés de colza contrastées (en terme de phénotype architectural et de précocité) ont été cultivées sous différents régimes de fertilisation azotée afin de mettre en évidence des mécanismes d'absorption et de remobilisation de l'azote différents.

Ce manuscrit est organisé en sept grandes parties. L'analyse bibliographique présente tout d'abord l'état des connaissances agronomiques et physiologiques acquises sur le colza. Puis les résultats correspondant aux trois chapitres suivants, sont exposés sous la forme d'article scientifique (cf. ci-dessous). Enfin, une discussion générale est suivie d'une conclusion et des perspectives de recherche qui découlent de ce travail.

Le chapitre « Valorisation des compétences : un Nouveau Chapitre de la Thèse » clôturera le manuscrit.

Ce travail de thèse a permis la rédaction des articles scientifiques suivants, correspondant aux 3 chapitres de résultats du manuscrit :

- **Gombert J, Le Dily F, Etienne P, Rossato L, Allirand J-M, Jullien A, Savin A, Ourry A.** Nitrogen Dynamics in Field Grown Winter Oilseed Rape. I. Effect of contrasted Nitrogen Fertilizations. ; *soumis à Annals of Botany*

- **Gombert J, Le Dily F, Etienne P, Allirand J-M, Jullien A, Pinochet X, Ourry A.** Nitrogen Dynamics in Field Grown Winter Oilseed Rape. II. Genotypic differences in interaction with N supply. ; *soumis à Annals of Botany*

- **Gombert J, Etienne P, Ourry A, Le Dily F. 2006.** The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1949-1956

Par ailleurs, ce travail de thèse s'est traduit par plusieurs participations à des congrès nationaux et internationaux :

- **Gombert J., Le Dily F., Etienne P., Ourry A.** Nitrogen dynamics in field grown oilseed rape. Effect of nitrogen fertilization and genotype. 12th International Rapeseed congress, Wuhan (CHINE), 26 – 30 March 2007 (Poster).

- **Gombert J., Etienne P., Le Dily F.** Metabolic changes and gene expression in senescing leaves of oilseed rape plants. 6^{ème} Colloque National de la Société Française Biologie Végétale, Arcachon (FRANCE), 27 – 29 Avril 2005 (Poster).

- **Gombert J., Le Dily F., Ourry A.** Influence du génotype et de la fertilisation azotée sur la gestion de l'azote chez le colza d'hiver (*Brassica napus* L.). Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie, Le Havre (FRANCE), 18 Mars 2005 (Prix de la meilleure communication orale).

Mon travail de thèse a été réalisé à l'UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments NCS, au sein de l'équipe « Etudes intégrées de l'absorption de l'azote et du soufre, de la mobilisation de ces éléments et de leur utilisation pour la croissance ». J'ai bénéficié pour ce travail d'un co-financement doctoral par le CETIOM (Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains) et le Conseil Régional de Basse-Normandie, ainsi que d'un soutien de programme accordé par Promosol, notamment pour les expérimentations conduites en collaboration avec l'UMR EGC de l'INA-PG.

Analyse bibliographique

Chapitre I. Analyse bibliographique

A La culture de colza

A.1 Grandes étapes dans l'amélioration du colza

Outre la productivité, principal critère en matière de sélection, l'amélioration des caractères agronomiques (précocité, résistance aux maladies et au froid...) et technologiques (qualité de l'huile et des tourteaux) du colza fut prise en compte dans les programmes de sélection. Parallèlement à l'augmentation de la teneur en huile des graines, la sélection s'attacha tout d'abord à améliorer la qualité de l'huile. Ainsi, l'acide érucique, considéré comme cancérigène par les nutritionnistes, fut éliminé de l'huile destinée à l'alimentation humaine conduisant aux variétés de colza « simple zéro ». Puis, en raison des troubles physiologiques provoqués chez les animaux par les glucosinolates contenus dans les tourteaux de colza, des variétés à teneur réduite ont été progressivement sélectionnées, aboutissant aux variétés « double zéro ». De réels progrès ont été réalisés en matière de résistance aux maladies (phoma, sclérotinia, hernie...) avec l'apparition de variétés très peu ou peu sensibles. En année de forte pression maladie sur des variétés sensibles, le phoma peut en effet entraîner jusqu'à 50% de perte de rendement (source : CETIOM). Enfin, à côté des lignées pures, se sont développés des types variétaux intermédiaires (lignées mixtes, associations variétales, hybrides mixtes et hybrides restaurés), ce qui a favorisé l'augmentation du rendement en graines et en huile ainsi que les caractères agronomiques du colza (résistance aux maladies...).

A.2 Evolution des surfaces cultivées et de la production

L'amélioration variétale a rendu la culture de colza davantage compétitive et attrayante, avec pour conséquence des surfaces cultivées qui n'ont cessé de croître depuis un demi siècle. La production mondiale de graines de colza, qui était de l'ordre de 7,1 millions de tonnes en 1974 (source : PROLEA), dépasse désormais 45 millions de tonnes (source : FAO, 2005). A l'échelle de l'Union Européenne à 25 Etats Membres, la culture de colza couvre 4,9 millions d'hectares et

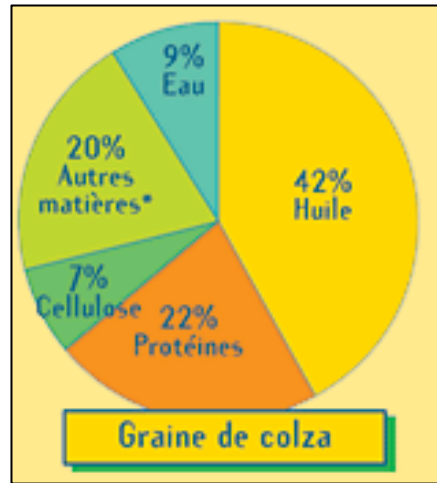


Figure I.1: Composition moyenne de la graine de colza (source: CETIOM)

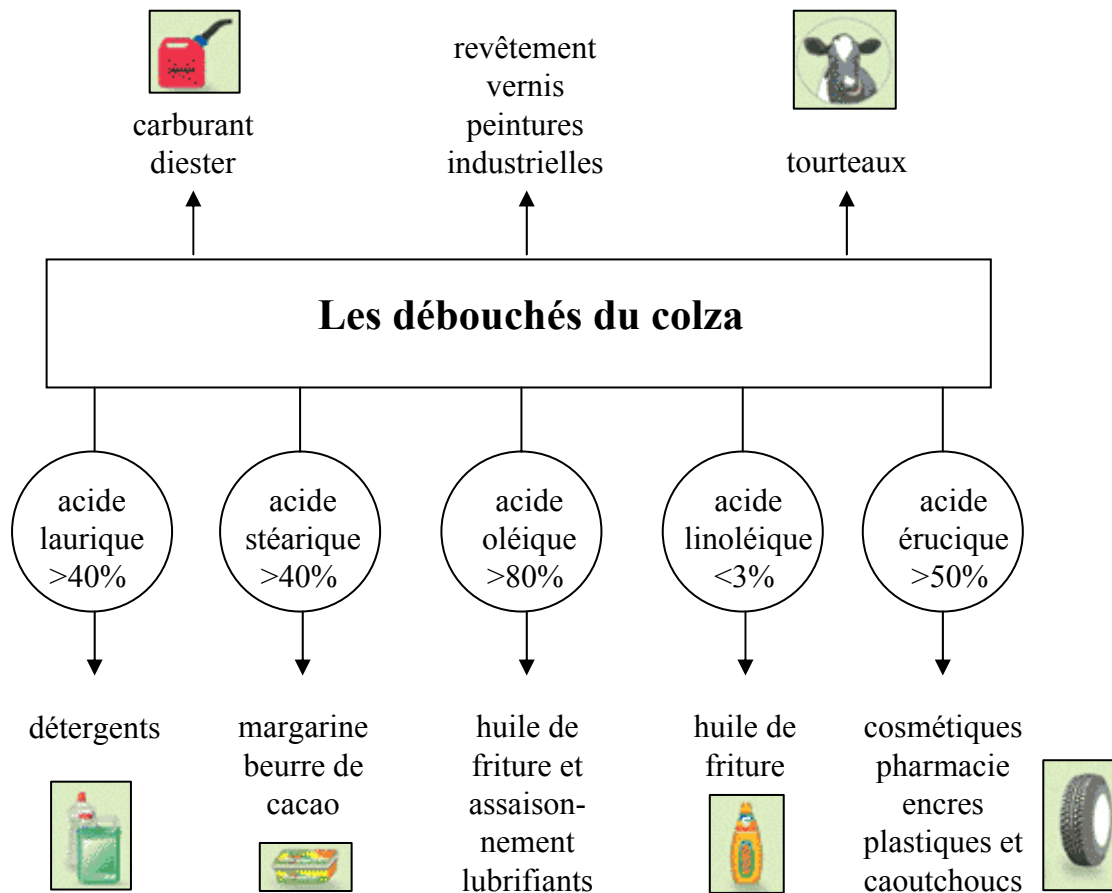


Figure I.2: Débouchés alimentaires et industriels du colza (d'après source: <http://www.maisadour-semences.com>)

assure une production de 16,2 millions de tonnes, l'Allemagne et la France étant les deux producteurs principaux (estimations précoces d'EuroStat, juin 2006). En France, bien que représentant seulement 60 000 hectares en 1960, les surfaces utilisées pour la culture de colza s'élèvent actuellement à 1,36 millions ha, correspondant à une production de 4 millions de tonnes, soit un rendement moyen de 29,4 q ha⁻¹ (source : Agreste, septembre 2006). En France, le colza d'hiver domine très largement, les surfaces cultivées par du colza de printemps ne s'élevaient qu'à 7 000 ha en 2006 (source : Agreste, septembre 2006).

A.3 Utilisations du colza

Les graines de colza présentent des teneurs particulièrement élevées en huile (42%) et en protéines (22%, Figure I.1). En conséquence, la trituration des graines pour la fabrication des huiles végétales constitue la principale utilisation en France alors que les tourteaux dérivés des sous produits de la trituration sont utilisés pour l'alimentation animale (source : Agreste 2005). Parallèlement, de nombreuses utilisations industrielles se sont développées (source : AMSOL-PROLEA). L'utilisation du colza comme ressource énergétique ou comme matière première pour l'industrie permet en effet de substituer une ressource fossile (produits pétroliers) par une ressource agricole renouvelable. Ainsi, l'huile de colza peut être utilisée pour la production de biocarburants, bio-lubrifiants, tensioactifs, solvants ou encore dans des intermédiaires chimiques (Figure I.2). De telles utilisations industrielles ont suscité le développement de variétés plus appropriées comme le colza à forte teneur en acide érucique, oléique ou stéarique. En raison du développement des biocarburants, la production d'ester de colza est passée de 40 000 tonnes en 1993 à 328 000 tonnes en 2003 (source : Agreste 2005). Entre 2000 et 2006, les surfaces cultivées en colza allouées aux cultures industrielles ont doublées et représentent actuellement 635 000 ha (source : CETIOM, ONIOL). En 2003, l'Union Européenne a adopté la directive sur la promotion des biocarburants qui fixe des objectifs de référence d'incorporation de biocarburant dans le carburant traditionnel : 2% en 2005 pour atteindre 5,75% en 2010. Cet objectif ne pourra être atteint que par une augmentation des rendements en graines et des surfaces cultivées (estimées à +0,5 million ha en France), nécessitant soit de nouvelles surfaces de culture, soit des rotations plus courtes.











À l'automne		Au printemps			
A - Stade cotylédonnaire	<p>Levée Les jeunes plantes marquent la ligne.</p> <p>Stade A (10) Stade cotylédonnaire.</p>  <p>Pas de feuilles "vraies". Seuls les deux cotylédons sont visibles.</p>	C - Montaison	<p>Stade C1 (31) Reprise de végétation. Apparition de jeunes feuilles.</p> <p>Stade C2 (32) Entre-noeuds visibles. On voit un étranglement vert clair à la base des nouveaux pétioles. C'est la tige.</p> 	F - Floraison	<p>Stade F1 (60) Premières fleurs ouvertes.</p> 
	<p>Stade B Apparition des feuilles. Pas d'entre-noeuds entre les pétioles. Absence de vraie tige.</p> <p>Stade B1 (11) 1 feuille vraie étalée ou déployée.</p> 		<p>Stade D1 (51) Boutons accolés encore cachés par les feuilles terminales.</p> 		<p>Stade F2 (61) Allongement de la hampe florale. Nombreuses fleurs ouvertes.</p> <p>Stade G1 (70) Chute des premiers pétales. Les 10 premières siliques ont une longueur inférieure à 2 cm. La floraison des inflorescences secondaires commence à ce stade.</p> 
B - Formation de la rosette	<p>Stade B2 (12) 2 feuilles vraies étalées ou déployées.</p> <p>Stade B3 (13) 3 feuilles vraies étalées ou déployées.</p> <p>Stade B4 (14) 4 feuilles vraies étalées ou déployées.</p> 	D - Boutons accolés	<p>Stade D2 (53) Inflorescence principale dégagée. Boutons accolés. Inflorescences secondaires visibles.</p>  <p>Au cours de ce stade, la tige atteint et dépasse la hauteur de 20 cm mesurée entre la base de la rosette et les bouquets floraux.</p>	G - Formation des siliques	<p>Stade G2 Les 10 premières siliques ont une longueur comprise entre 2 et 4 cm.</p> <p>Stade G3 Les 10 premières siliques ont une longueur supérieure à 4 cm.</p> <p>Stade G4 (73) Les 10 premières siliques sont bosselées.</p> 
	<p>Stade Bn (1n) n feuilles vraies étalées ou déployées.</p>		<p>Stade E (59) Les pédoncules floraux s'allongent en commençant par ceux de la périphérie.</p> 		<p>Stade G5 (81) - Grains colorés.</p>
	E - Boutons séparés				

Figure I.3: Principaux stades repères du développement ontogénétique du colza, la nomenclature anglo-saxonne est indiquée entre parenthèse. D'après documentation CETIOM.

A.4 Cycle ontogénétique du colza d'hiver

D'après Sylvester-Bradley et Makepeace (1985), le développement du colza se décompose en 10 étapes, sachant que plusieurs d'entre elles se chevauchent : germination/ levée, production de feuilles, extension de la tige, développement du bourgeon floral, floraison, développement des siliques, développement des graines, sénescence des feuilles, sénescence de la tige et sénescence des siliques (Figure I.3).

En France, le colza d'hiver est généralement semé fin août – début septembre. Le temps séparant le semis de la levée (environ 150 °CJ) varie en fonction de la température du sol, de son taux d'humidité et de la position de la graine dans le sol. A la levée, le colza développe deux cotylédons puis la plante produit un pivot et une vingtaine de feuilles de rosette nécessaire pour résister aux faibles températures de l'hiver. Le zéro végétatif du colza étant de 4°C, la croissance est progressivement ralentie en fin d'automne et stoppée durant la période hivernale. Le froid est cependant nécessaire à l'initiation florale du colza d'hiver (vernalisation). Généralement, une température inférieure à 10°C durant une quarantaine de jours est requise. Cependant, la durée de vernalisation est d'autant plus faible que la température est basse, l'héméroperiode longue et les plantes âgées (Leterme, 1988). L'initiation florale a lieu dès le début du mois de novembre (pour un semis précoce) jusqu'à mi-décembre (pour un semis tardif).

A la fin de l'hiver, lorsque la température journalière dépasse régulièrement 5°C, la croissance reprend. La date de reprise de végétation dépend cependant plus de celle du semis que de la température (Tittonel *et al.*, 1988). La croissance printanière se caractérise par une forte production foliaire associée à une surface foliaire élevée, les feuilles étant les sites majeurs de photosynthèse jusqu'à la floraison. Parallèlement, la tige s'allonge (montaison) et se ramifie.

La floraison a lieu à une date relativement « fixe » car elle est fortement liée au photopériodisme. La floraison est favorisée par les jours longs mais elle est également influencée par la précocité des cultivars. La floraison s'échelonne sur 4 à 6 semaines (généralement avril-mai en France) et commence par l'inflorescence principale suivie des ramifications, les fleurs s'ouvrant toujours de manière basifuge (de la base vers l'extrémité de l'inflorescence).

Parallèlement à la floraison, le développement des premières siliques a lieu, également de manière basifuge. Les siliques puis les graines se forment progressivement. A la maturité, les tiges et les siliques de la plante sont sénescentes et le moindre choc peut provoquer la déhiscence des siliques, et donc la libération des graines. La récolte a lieu lorsque le taux d'humidité des graines est inférieur à 15%.

A.5 Intérêts agronomiques du colza

Outre ses multiples débouchés, le colza présente de nombreux avantages agronomiques liés à la physiologie propre de la plante.

A.5.1 *Structure et fertilité du sol*

L'enracinement profond de cette culture (jusqu'à 2 m) permet une bonne restructuration du sol. Sa capacité d'absorption du nitrate du sol particulièrement élevée fait du colza une plante « pompe à nitrate ». L'azote absorbé durant l'automne limite les pertes de nitrate par lessivage et le maintien des repousses en été permet de mobiliser l'azote minéral du sol, en réduisant le lessivage hivernal avant la céréale suivante.

A.5.2 *Maladies et adventices*

La culture du colza permet de rompre le cycle des maladies des céréales qui sont favorisées par des rotations céréalières courtes (piétin verse, fusarioses...). A l'effet rupture s'ajoute celui de la biofumigation, c'est-à-dire de la décomposition des résidus de culture riches en glucosinolates qui, en produisant des isothiocyanates, inhibent le développement de nombreux champignons du sol. De plus, l'alternance de dés herbants appartenant à des familles chimiques différentes selon les cultures ainsi que les écarts de date de semis entre le colza et les autres cultures favorise la gestion des adventices.

A.5.3 *Lutte contre l'érosion, effet de serre et paysager*

La présence de la culture de colza dix mois sur douze prévient l'érosion du sol (érosion pouvant atteindre plusieurs tonnes de terre par hectare et par an) et l'enfouissement systématique des pailles de colza contribue à augmenter le taux de matière organique du sol. Le carbone stocké dans les sols agricoles contribue ainsi à la diminution de l'effet de serre. D'un point de vue paysager, le colza verdit les campagnes toute l'année et ses champs jaunes resplendent d'avril à mai (source : CETIOM).

A.6 Elaboration du rendement

La floraison constitue l'étape critique dans l'élaboration du rendement. En effet, le nombre de siliques et de graines est fixé au cours des 4 à 6 semaines de floraison (Diepenbrock *et al.*, 2000). La disponibilité en assimilats est donc primordiale à la croissance des siliques et elle est gouvernée par les relations source-puits au sein de la plante (Evans, 1984 ; Keiller et Morgan, 1988). Ainsi, l'apport d'azote au cours du développement végétatif augmente l'indice de surface

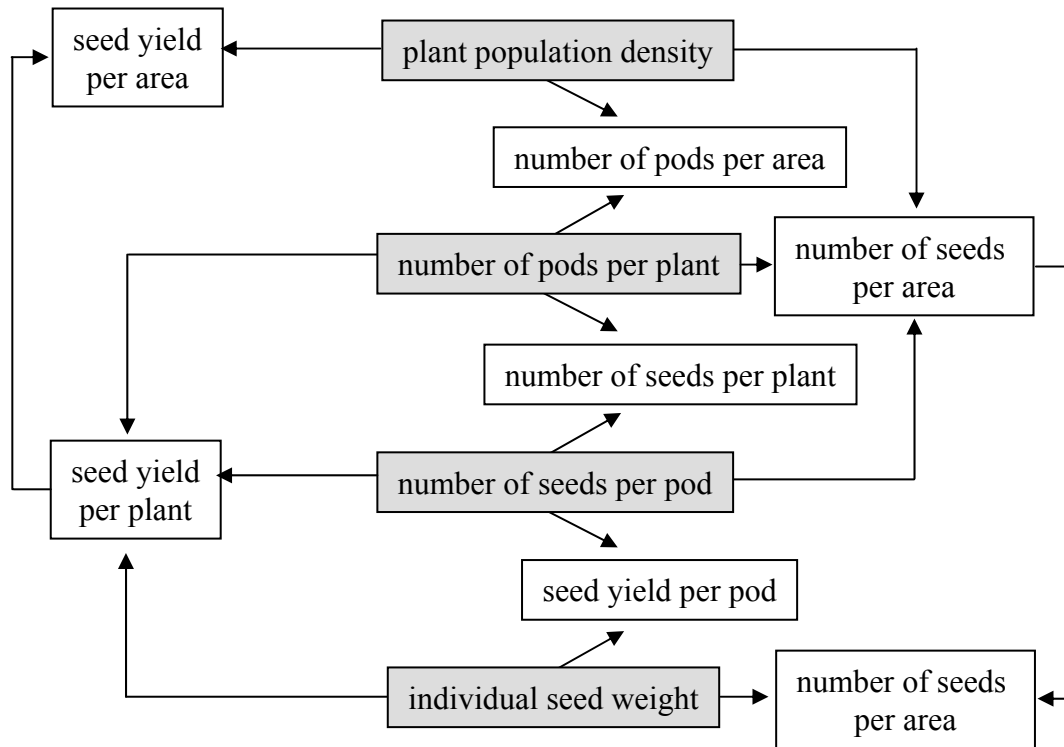


Figure I.4: Structure du rendement de colza en composantes primaires (rectangles grisés) et secondaires (rectangles blancs). D'après Diepenbrock et Grosse, 1995, cité par Diepenbrock, 2000.

foliaire (LAI, pour Leaf Area Index) ainsi que le maintien de la surface photosynthétiquement active, ce qui conduit à un nombre plus important de siliques par plante (Allen et Morgan, 1972).

Le rendement en graines peut être décomposé comme le produit de la densité du couvert par le nombre de siliques par plante, par le nombre de graines par silique et enfin, par le poids d'une graine. A côté de ces composantes primaires, des composantes secondaires du rendement (nombre de siliques et/ou de graines par unité de surface...) ont également été définies par Diepenbrock et Grosse (1995 ; cité par Diepenbrock, 2000, Figure I.4).

La densité est une composante particulièrement importante car elle affecte le rendement à l'échelle de la plante. Une variabilité importante de la distance entre les plantes d'un même rang, tout comme une densité de semis trop élevée, entraîne une diminution du rendement potentiel (Huehn, 1998). A l'inverse, une distribution uniforme des plantes diminue la compétition intra-spécifique et permet d'obtenir un rendement plus stable. De plus, le nombre de siliques par plantes est corrélé négativement au nombre de plantes par unité de surface. Donc, une forte densité de semis, en induisant une augmentation de la compétition intra-spécifique, conduira à une réduction du nombre de ramifications mais également du nombre de siliques par ramification et du nombre de graines par silique. La tige principale est moins affectée, indiquant que sa contribution relative au nombre de siliques par plante augmente lorsque la densité augmente. De plus, le nombre de graines par silique diminue de la tige principale vers les ramifications les plus basses.

En Europe, un semis tardif à l'automne se traduit souvent par un plus grand nombre de graines par silique. A l'inverse, un semis précoce conduit à un rendement important en biomasse et à un nombre élevé de siliques dont beaucoup finiront par avorter. La perte de siliques en développement s'explique par une limitation en assimilats. Par exemple, lors de la floraison, l'asynchronisme entre la photosynthèse des feuilles et des siliques induit une diminution des assimilats carbonés disponibles.

A.7 Indicateurs agronomiques de l'efficacité de la fertilisation azotée

De nombreux indicateurs agronomiques rendent compte de l'efficacité avec laquelle une culture utilise les nutriments disponibles, en particulier l'azote, pour l'élaboration du rendement.

L'indice de récolte en azote (IRN ou NHI pour Nitrogen Harvest Index) constitue l'indicateur le plus largement utilisé. L'IRN représente la part d'azote dans les graines par rapport à l'azote présent dans l'ensemble des parties aériennes à la récolte. L'IRN du colza est

relativement faible, généralement inférieur à 50%, alors que chez les céréales il peut dépasser 80%.

En ce qui concerne l'efficacité de l'azote, les définitions des indicateurs ainsi que leurs méthodes de calcul ne sont pas clairement établies et varient dans la littérature selon les auteurs. Ainsi, l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA, ou NUE pour N Use Efficiency) peut être définie comme le rapport du rendement (en kg de graines ou en kg glucose dans les graines) sur la quantité d'azote accumulé dans les parties aériennes à la récolte (kg N ha^{-1}). Le NUE s'exprime alors en $\text{kg kg}^{-1} \text{ N}$ (Hocking *et al.*, 1997 ; Barlog et Grzebisz, 2004) ou bien en $\text{kg glucose dans les graines kg}^{-1} \text{ N}$ (Dreccer *et al.*, 2000). En ce qui nous concerne, nous nous appuyons sur les travaux de Sattelmacher *et al.* (1994) qui attribuent à l'efficacité de l'azote la capacité d'une plante à réaliser un rendement au dessus de la moyenne dans des conditions non optimales de fertilisation azotée. Selon les auteurs, le NUE comporte deux composantes. La première composante est l'efficacité d'absorption de l'azote (NUpE pour N Uptake Efficiency) qui représente la quantité d'azote absorbé par la plante par rapport à la quantité totale d'azote disponible dans le sol. La quantité totale d'azote disponible dans le sol est constituée par la quantité initiale d'azote du sol, par la quantité d'azote issu de la minéralisation des matières organiques du sol et par la quantité d'azote apporté par fertilisation. La seconde composante du NUE est l'efficacité avec laquelle l'azote est utilisé pour élaborer le rendement (NUtE pour N Utilization Efficiency). Cette efficacité d'utilisation de l'azote correspond au rendement en graines par rapport à la quantité totale d'azote absorbée, et s'exprime donc en $\text{kg kg}^{-1} \text{ N}$.

D'autres efficacités de l'azote ont également été définies comme par exemple l'efficacité physiologique et agronomique. L'efficacité physiologique de l'azote ($\text{kg kg}^{-1} \text{ N}$) correspond à la différence de rendement entre une parcelle fertilisée et non fertilisée (kg ha^{-1}) sur la différence de quantités d'azote des parties aériennes fertilisées et non fertilisées (kg N ha^{-1} ; Smith *et al.*, 1988 ; Hocking *et al.*, 1997 ; Barlog et Grzebisz, 2004). L'efficacité agronomique de l'azote peut être estimée par le rapport entre le rendement et l'azote fourni sous forme d'engrais (Dreccer *et al.*, 2000) mais également par la différence du rendement entre une parcelle fertilisée et non fertilisée sur la fertilisation azotée apportée et nécessite donc, dans ce cas, la comparaison deux parcelles, l'une ayant reçu une fertilisation azotée et l'autre non (Hocking *et al.*, 1997 ; Barlog et Grzebisz, 2004). Le rendement est exprimé en kg de graines ou en kg de glucose dans les graines selon les auteurs.

A.8 Fertilisation azotée et bilan environnemental

Malgré une capacité d'absorption du nitrate particulièrement élevée, le colza possède un IRN relativement faible. Cela signifie que la part d'azote retrouvé dans les graines, à maturité de récolte, est faible par rapport à la quantité d'azote accumulée par la plante. En conséquence, le colza requiert une fertilisation azotée particulièrement importante par rapport à d'autres cultures. En effet, alors que l'apport de 30 kg N ha⁻¹ permet un rendement de 10 q ha⁻¹ chez le blé, 50 à 70 kg N ha⁻¹ sont nécessaires à la culture de colza pour obtenir un rendement identique, soit compte tenu du rendement moyen (30 q ha⁻¹), une fertilisation azotée de 150 à 210 kg N ha⁻¹ (Rathke *et al.*, 2006). Cette fertilisation azotée importante entraîne des risques de pertes d'azote vers l'environnement dont le lessivage de nitrate vers l'eau des nappes phréatiques, ou encore l'entraînement en surface du nitrate vers les cours d'eau, accentuant de ce fait les risques d'eutrophisation, et également le rejet vers l'atmosphère de composés gazeux dont l'ammoniac et l'oxyde nitreux (gaz impliqué dans l'effet de serre). Le bilan environnemental du colza potentiellement négatif, souligne l'importance d'ajuster de manière optimale la fertilisation azotée aux besoins de la plante.

La forte capacité d'absorption du colza permet la mise en place du couvert à l'automne sans qu'aucune fertilisation azotée ne soit apportée. D'ailleurs, toute fertilisation azotée est désormais interdite en France du 1^{er} septembre au 15 janvier dans les zones où les pertes par lessivage ou ruissellement sont potentiellement élevées. De plus, les carences azotées à l'automne ne sont pas préjudiciables sur le rendement potentiel et l'efficacité d'utilisation de l'azote est plus faible à l'automne qu'au printemps. Ainsi, quand l'azote apporté à l'automne est absorbé, la croissance des plantes est plus élevée mais le rendement final n'est pas augmenté. D'autre part, une trop forte absorption d'azote à l'automne (supérieure à 100 kg N ha⁻¹) peut entraîner un début d'allongement de la tige qui va être particulièrement sensible au gel et constituer une « porte d'entrée » au phoma (source : CETIOM).

Au printemps, l'objectif de la fertilisation azotée est de compléter les fournitures du sol de manière à satisfaire les besoins en azote de la plante. La dose optimale à apporter dépend donc du reliquat en sortie hiver. Si la dose à appliquer est inférieure à 100 kg N ha⁻¹, l'engrais est apporté en début de montaison. Par contre, si la dose dépasse 100 kg N ha⁻¹, il est conseillé de réaliser 2 apports, voire même 3 si la dose dépasse 170 kg N ha⁻¹. Le premier apport a lieu à la reprise de végétation, le second au cours de la montaison et le troisième en fin de montaison (source : CETIOM).

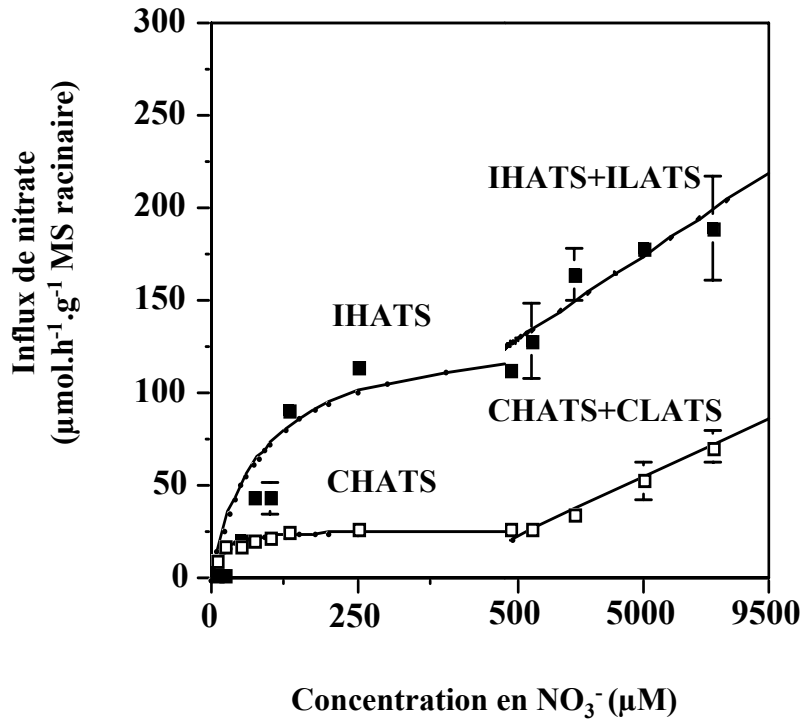


Figure I.5 : Cinétiques d'absorption du nitrate par les composantes constitutives (C) et inductibles (I) des systèmes de transport HATS et LATS chez le colza en fonction de la concentration en NO_3^- de la solution nutritive. L'activité réelle des systèmes d'absorption LATS est obtenue en déduisant les valeurs d'influx des systèmes HATS aux valeurs d'influx obtenues pour les systèmes HATS + LATS. D'après Faure-Rabasse *et al.* (2002).

B Absorption et Allocation de l'azote

Le nitrate constitue la principale source d'azote disponible pour les plantes dans les sols aérés où la nitrification est rapide. Une fois absorbé par les transporteurs situés sur les racines (NRT pour Nitrate Transporter), le nitrate peut être réduit en nitrite par la nitrate réductase puis en ammonium par la nitrite réductase dans les cellules racinaires, ou stocké dans les vacuoles ou exporté vers les feuilles pour y être réduit ou encore stocké.

B.1 Absorption de l'azote

B.1.1 Systèmes de transport impliqués

Chez les végétaux supérieurs, l'absorption du nitrate est, selon une caractérisation physiologique, sous la dépendance de trois ou quatre systèmes de transport qui diffèrent par leur affinité pour le nitrate et par leur caractère constitutif ou inductible (Siddiqi *et al.*, 1990). Le système à forte affinité HATS (High Affinity Transport System) est responsable de l'absorption à de faibles concentrations en nitrate (quelques dizaines de micromoles par litre) alors que le système à faible affinité LATS (Low Affinity Transport System) intervient à des concentrations élevées de nitrate (de l'ordre des millimoles par litre, Siddiqi *et al.*, 1990 ; Grignon *et al.*, 1997). Le système d'absorption présentant une forte affinité présente une composante inductible et une composante exprimée constitutivement (IHATS et CHATS, respectivement). Par contre, le système de transport fonctionnant à forte concentration présente en général une seule composante constitutive (Siddiqi *et al.*, 1990 ; Glass et Siddiqi, 1995), avec cependant chez le colza, la description d'une composante inductible supplémentaire (CLATS et ILATS, Faure-Rabasse *et al.*, 2002, Figure I.5).

Les transporteurs de nitrate sont codés par deux familles de gènes : les gènes *NRT1* et *NRT2*, impliqués respectivement dans le transport à faible et à forte affinité (Forde, 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, 52 gènes *NRT1* et 7 gènes *NRT2* ont été identifiés. Les transporteurs *NRT2* sont majoritairement exprimés dans les racines, à l'exception du gène *AtNRT2.7* préférentiellement exprimé dans les feuilles (Orsel *et al.*, 2002). Sur les 52 transporteurs *NRT1*, seuls *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2* et *AtNRT1.4* ont été caractérisés au niveau physiologiques et confirmés comme protéines contribuant au LATS (Tsay *et al.*, 1993 ; Huang *et al.*, 1996, 1999 ; Chiu *et al.*, 2004).

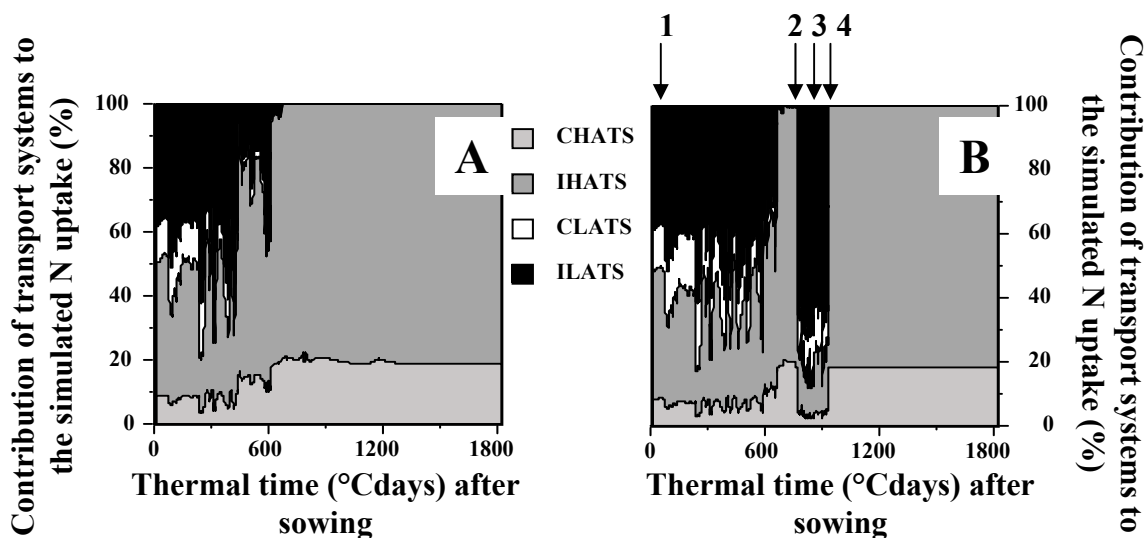


Figure I.6 : Contribution (%) des composantes constitutives (C) et inductibles (I) des systèmes de transport HATS et LATS au prélèvement d'azote nitrique simulé par une culture de colza en fonction des deux niveaux de fertilisation appliquées (A: 0 kg N ha⁻¹; B: 273 kg N ha⁻¹). 1, 2, 3 et 4 correspondent aux dates d'application des intrants azotes pour le traitement N2 (1: 49 kg N ha⁻¹; 2: 78 kg N ha⁻¹; 3: 107 kg N ha⁻¹; 4: 39 kg N ha⁻¹). D'après Malagoli *et al.*, 2004.

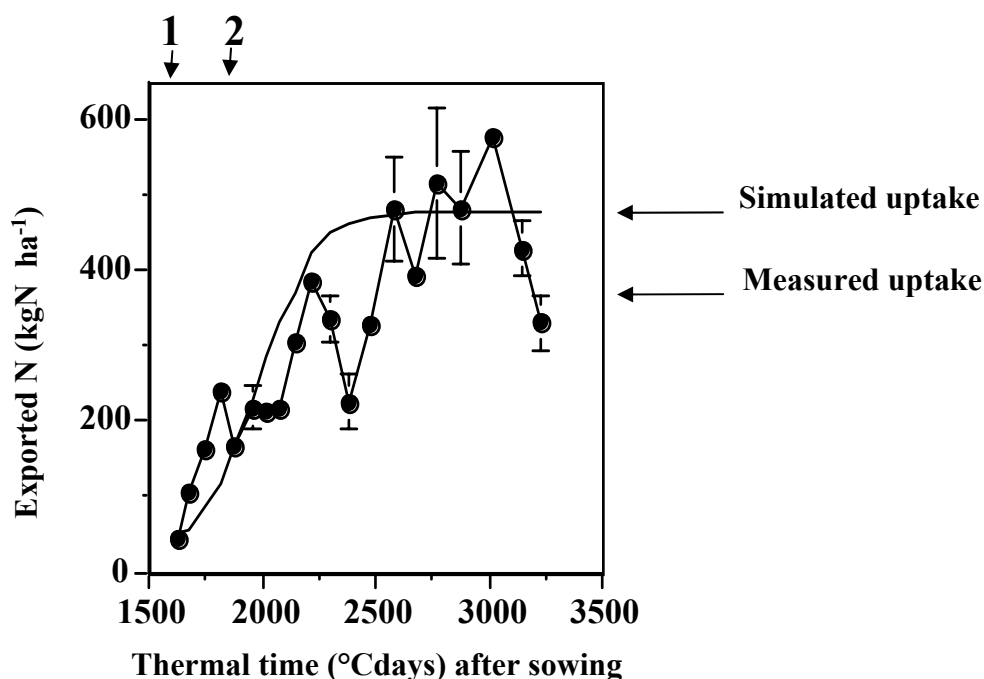


Figure I.7 : Simulation de la quantité de nitrate (kgN. ha⁻¹) prélevée par une culture de colza au champ depuis la reprise de végétation jusqu'à la récolte. Les doses d'intrants azotés ont été apportées à la reprise de végétation et pendant l'élongation de la hampe. Les flèches 1 et 2 indiquent les dates des apports (1; 75 kg N ha⁻¹; 2; 150 kg N ha⁻¹). D'après Malagoli *et al.*, 2004.

Chez le colza, les cinétiques d'absorption liées à l'activité des différents transporteurs ont été définies en conditions contrôlées par Faure-Rabasse *et al.* (2002). A partir de ces données et de celles de la banque Colza de l'INRA (<http://www-bioclim.inra.grignon.fr>), Malagoli *et al.* (2004) ont défini un modèle d'absorption du nitrate chez le colza au cours d'un cycle de culture. Les effets de différents facteurs (température des racines, disponibilité en nitrate du sol, rayonnement, cycle nyctéméral et ontogénétique) sur les systèmes de transport ont été déterminés et intégrés au modèle en tant que variables auxiliaires de manière à améliorer les prédictions du modèle. Ces travaux ont montré que le système HATS représente 89% de l'absorption en absence de fertilisation azotée et que le système LATS n'intervient que de façon mineure après l'implantation de la culture, en présence d'une minéralisation automnale importante ou bien immédiatement après une fertilisation azotée (Figure I.6). Ce modèle permet de simuler l'absorption du nitrate par une culture de colza au cours d'un cycle de culture, en prenant en compte à la fois des processus physiologiques régulés au niveau de la plante entière et les caractéristiques spécifiques des systèmes de transport racinaires (Figure I.7).

B.1.2 Régulation de l'absorption du nitrate

Bien que l'absorption nette de nitrate soit la résultante de l'influx et de l'efflux de nitrate entre le milieu extérieur et la racine, l'efflux de nitrate est souvent négligé d'un point de vue agronomique; d'autant que l'importance de celui-ci, mineure en condition de culture hydroponique, est fonction de la teneur élevée des racines en nitrate. L'azote minéral est généralement considéré comme le principal facteur limitant la croissance des plantes et donc les accumulations racinaires de nitrate sont rares pour des végétaux cultivés en plein champ. Aucun efflux de nitrate n'a été mis en évidence chez des plantes cultivées au champ en raison, notamment, des difficultés méthodologiques associées.

L'absorption du nitrate est régulée à la fois par la disponibilité en substrat du milieu et par le statut nutritionnel de la plante. D'après le modèle de Ben Zioni (1971), les acides organiques issus de la réduction du nitrate dans les parties aériennes exercent un contrôle positif sur l'absorption. La réduction foliaire du nitrate s'accompagne d'une production d'ions hydroxyles induisant la synthèse d'acides organiques qui seront exportés vers les racines *via* le phloème en compagnie d'ion potassium. La décarboxylation des acides organiques permettrait alors l'excrétion d'ion carbonate dans le cadre d'un antiport avec un ion nitrate. Dans ce cadre, la réduction foliaire de nitrate favoriserait son absorption racinaire. Ce modèle assez ancien, même s'il ne peut être totalement exclu, n'est pas conforté par les données récentes notamment de biologie moléculaire qui envisagent plutôt un antiport de deux protons pour un ion nitrate. Chez

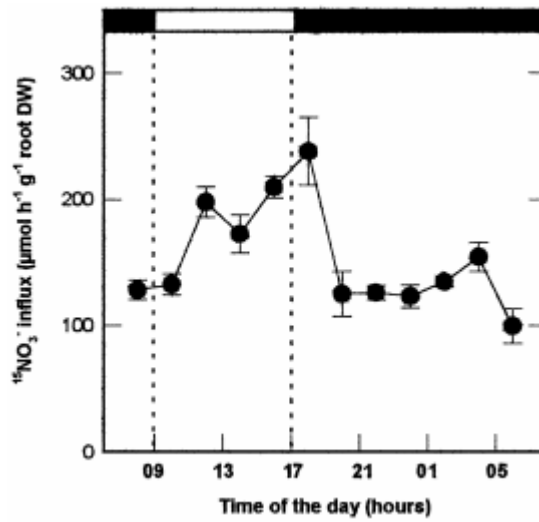


Figure I.8 : Variation de l'influx racinaire de $^{15}\text{NO}_3^-$ chez *Arabidopsis thaliana*, en fonction de l'éclairage (rectangle blanc: éclairage, rectangles noirs: obscurité). D'après Lejay *et al.* (1999).

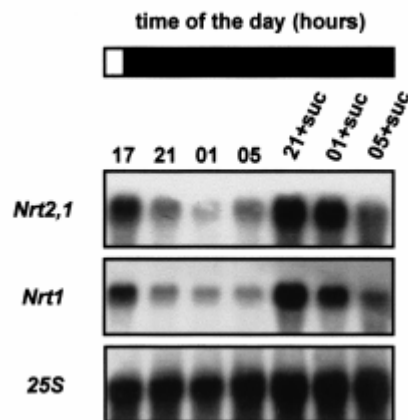


Figure I.9 : Effet du saccharose (suc) sur l'expression des gènes *NRT2;1* et *NRT1* dans des racines d'*Arabidopsis thaliana* cultivées dans une solution nutritive de 1 mM NO_3^- . D'après Lejay *et al.* (1999).

le colza, la chute des feuilles à partir de la floraison entraîne une réduction de la surface foliaire et par conséquent, de l'assimilation foliaire d'azote. Ainsi, la chute de la synthèse des acides organiques entraîne une diminution de l'absorption (Ismande et Tourraine, 1994).

Par ailleurs, il a été montré que le pool d'acides aminés circulant entre les racines et les parties aériennes *via* le xylème et le phloème exerce un rétro-contrôle négatif sur l'absorption (Cooper et Clarkson, 1989 ; Ismande et Tourraine, 1994). Chez le colza, la glutamine représente le principal acide aminé qui rétro-inhibe l'activité du IHATS au niveau transcriptionnel (Beuve *et al.*, 2004). A l'opposé, le GABA (acide α -amino butyrique) exerce un rétro-contrôle positif sur l'absorption de nitrate en condition de carence azotée ou de forte demande en azote (Beuve *et al.*, 2004).

Ainsi, les variations de l'absorption du nitrate au cours du cycle nycthéral et du cycle ontogénétique sont régulées par les produits d'assimilation du nitrate et/ou de la photosynthèse. En effet, les variations nycthérales de l'absorption de nitrate sont liées aux fluctuations de l'éclairement, une chute de l'absorption étant observée lors de la transition jour/nuite (Dehlon *et al.*, 1995 ; Lejay *et al.*, 1999, Figure I.8). La chute de l'absorption à l'obscurité pourrait être due à une limitation énergétique ou bien à un déséquilibre entre la photosynthèse et l'absorption (Dehlon *et al.*, 1996). De plus, certains sucres pourraient agir comme une molécule signal induisant l'expression des gènes impliqués dans l'absorption, l'addition de saccharose dans le milieu de culture à l'obscurité induisant l'expression des gènes *AtNRT1.1* et *AtNRT2.1* (Lejay *et al.*, 1999 ; 2003, Figure I.9). Cependant, les voies de transduction restent à identifier.

Au cours du cycle ontogénétique du colza, une chute de l'absorption a été observée lors de la transition phase végétative/phase reproductrice chez des plantes cultivées en hydroponie (Rossato *et al.*, 2001). Lors de la phase reproductrice, l'absorption se trouve à la fois inhibée par la chute d'acides organiques et par le pool d'acides aminés circulant dans le phloème, issu de la remobilisation de l'azote foliaire.

Enfin, plusieurs travaux suggèrent un rétro-contrôle négatif de l'absorption par le nitrate racinaire ou au niveau de la plante entière (Forde, 2002 ; Britto et Kronzucker, 2003), cependant les voies de transduction du signal nitrate restent à identifier.

B.1.3 Cinétique d'accumulation de l'azote chez le colza au cours d'un cycle de culture

Chez le colza, les cinétiques d'accumulation de l'azote sont étroitement liées au stade de développement de la plante. Ainsi, la demande en azote du colza d'hiver est relativement faible lors de la mise en place de la rosette à l'automne, période au cours de laquelle il va accumuler environ 25 à 30% de l'azote absorbé total (Rathke *et al.*, 2006). La demande en azote devient

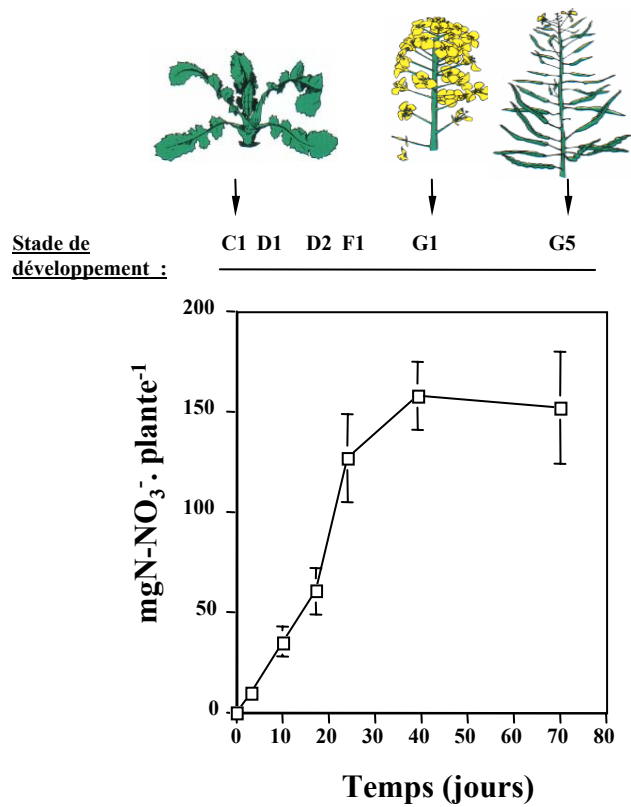


Figure I.10 : Absorption cumulée de nitrate estimée par marquage au $^{15}\text{NO}_3^-$ pendant 70 jours et en conditions de culture hydroponique. Les stades indiqués (C à G) correspondent à ceux définis par le CETIOM. C1 : montaison; F : début floraison; G : début formation des siliques; G5 : graines colorées. D'après Rossato *et al.* (2001).

très élevée à la reprise de végétation et jusqu'à la floraison, que les plantes soient cultivées en conditions contrôlées (Wright *et al.*, 1988 ; Rossato *et al.*, 2001) ou en condition de plein champ (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Gabrielle *et al.*, 1998 ; Malagoli *et al.*, 2005a). Chez le colza de printemps, l'accumulation d'azote est élevée du stade rosette jusqu'à la floraison (Hocking *et al.*, 1997 ; Chamorro *et al.*, 2002). Au cours de la floraison, l'absorption d'azote est ralentie (Merrien *et al.*, 1988 ; Wright *et al.*, 1988 ; Jensen *et al.*, 1997 ; Gabrielle *et al.*, 1998, Chamorro *et al.*, 2002 ; Malagoli *et al.*, 2005a), voire même stoppée (Rossato *et al.*, 2001, Figure I.10). Cette réduction ou cet arrêt de l'absorption de nitrate lors de la floraison implique que le remplissage en azote des graines se fait essentiellement ou exclusivement grâce au recyclage de l'azote contenu dans les organes végétatifs.

La chute de l'absorption lors de la floraison n'est toujours pas clairement expliquée. Il a été avancé qu'un stress hydrique pouvait entraîner une diminution de la diffusion du nitrate dans le sol (Merrien *et al.*, 1988). Conformément à cette hypothèse, un maintien de l'absorption jusqu'à la maturité des graines a été observé en présence d'irrigation et de fertilisation azotée (Wright *et al.*, 1988). Cependant, d'après Imsande et Tourraine (1994), l'absorption de l'azote serait davantage gouvernée par les besoins de la plante plus que par la disponibilité de l'azote dans le milieu racinaire. Les travaux de Rossato *et al.* (2001) ont mis en évidence un arrêt de l'absorption du nitrate lors de la floraison grâce à l'utilisation de $^{15}\text{NO}_3$ chez des plantes cultivées en hydroponie. Ces mêmes auteurs ont montré que des applications foliaires de méthyl jasmonate (dérivé ester méthylique de l'acide jasmonique) ou des solutions nutritives contenant du méthyl jasmonate, entraînaient une chute rapide de l'absorption du nitrate. Ainsi, ils ont émis l'hypothèse que la synthèse de cette phytohormone par les boutons floraux et les organes sénescents serait à l'origine de la réduction de l'absorption.

D'autres hypothèses reposent sur le fait que la réduction de l'absorption à la floraison coïncide avec une importante sénescence foliaire associée à des processus d'auto-ombrage, avec pour conséquence une diminution des photoassimilats alloués vers le système racinaire qui serait responsable de la réduction de l'absorption (Rood *et al.*, 1984). L'entrée en sénescence de nombreuses feuilles lors de la phase reproductrice est en partie due à l'atténuation du PAR (Mendham 1981, Chapman 1984) mais également à la mise en place de nouveaux organes puits pour l'azote (inflorescences, siliques).

Par ailleurs, plusieurs travaux rapportent une absorption post floraison (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Hocking *et al.*, 1997 ; Chamorro *et al.*, 2002 ; Barlog et Grzebisz, 2004 ; Malagoli *et al.*, 2005a). L'absorption post-floraison particulièrement élevée, observée par Malagoli *et al.* (2005a), représente 30% de l'azote total absorbé depuis la reprise de végétation mais doit être

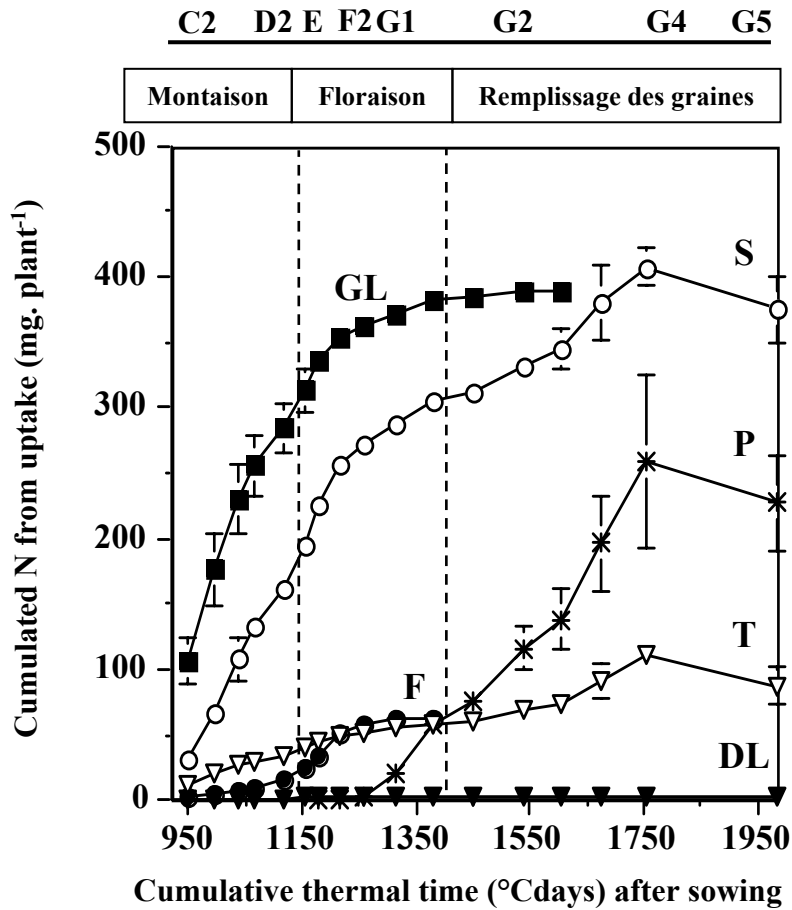


Figure I.11 : Accumulation de la quantité d'azote issu de l'absorption, estimée par un marquage ¹⁵N, allouée dans les différents tissus: pivot (T), feuilles vertes (GL), feuilles mortes (DL), tiges (S), inflorescences (F), siliques (P) chez le colza depuis la reprise de végétation jusqu'au stade maturité des graines. D'après Malagoli *et al.*, 2005a

reliée aux conditions supra optimales de fertilisation azotée utilisées dans ces travaux (225 kg N ha⁻¹). Chez le maïs et l'orge, bien que l'absorption post-floraison soit respectivement supérieure et inférieure à l'absorption pré-floraison, elle est corrélée au rendement chez ces deux espèces (Montemurro *et al.*, 2006).

B.2 Allocation de l'azote absorbé chez le colza

B.2.1 *Depuis le semis jusqu'à la reprise de végétation*

L'absorption d'azote au cours de la phase automnale permet la mise en place du couvert. L'azote absorbé est ainsi alloué aux feuilles de la rosette et au système racinaire, permettant à la plante de supporter la période hivernale. Cependant, les basses températures et le faible rayonnement durant l'hiver conduisent à une chute de feuilles. Les pertes d'azote par chute foliaire peuvent atteindre 100 kg N ha⁻¹ (Dejoux *et al.*, 1999), cependant une partie de l'azote perdu (environ 28%) pourra être réabsorbé par la plante au printemps (Dejoux *et al.*, 2000).

B.2.2 *Depuis la reprise de végétation jusqu'à la maturité*

Depuis la reprise de végétation jusqu'au début du remplissage des graines et selon leur force puits en azote, les organes sont par ordre décroissant : les feuilles, les tiges, le pivot et les inflorescences (Malagoli *et al.*, 2005a, Figure I.11). Les feuilles constituent en effet le principal puits d'azote à la reprise de végétation, recevant environ 75% de l'azote absorbé (Schoerring *et al.*, 1995; Rossato *et al.*, 2001 ; Chamorro *et al.*, 2002 ; Malagoli *et al.*, 2005a). Rapidement, au cours de la montaison et de la floraison, l'allocation de l'azote s'étend aux autres organes. Ainsi, si l'on considère un arrêt de l'absorption avant la mise en place des siliques, environ 36% de l'azote total absorbé depuis la reprise de végétation est alloué aux tiges, 30% aux feuilles, 17% aux inflorescences, 10% au pivot, 5% aux racines et 2% sera contenu dans les feuilles lors de leur chute (Rossato *et al.*, 2001). Cependant, lors d'une absorption post-floraison, les siliques constituent alors les organes puits les plus importants de la plante et reçoivent donc la majorité de l'azote absorbé (Malagoli *et al.*, 2005a). De manière similaire, Schiltz *et al.* (2005) soulignent un changement d'allocation de l'azote absorbé au cours de la phase végétative et reproductrice chez le pois. La proportion d'azote absorbé alloué aux graines passe ainsi de 24% au début du remplissage des graines de la première strate à 53% lorsque les graines de la deuxième strate débutent leur remplissage. Malgré le maintien de l'absorption durant le remplissage des graines, la part d'azote des graines issue de l'absorption reste faible chez le colza comme chez le pois (environ 30%, Malagoli *et al.*, 2005a; Schiltz *et al.* 2005).

C Mise en réserve et remobilisation de l'azote

C.1 Mise en réserve

C.1.1 *Rôle des réserves azotées*

L'azote est un élément essentiel à la croissance des végétaux mais sa disponibilité dans le sol est très variable. La mise en réserve de l'azote permet aux plantes pérennes et annuelles de mobiliser cet azote quand celui-ci devient limitant. Leur croissance est maintenue et leur pérennité assurée (Chapin *et al.*, 1990).

Millard (1988) a mis en évidence deux types de mises en réserve : à court terme et à long terme. A court terme, elle permet lors d'une disponibilité élevée en azote, une croissance optimale ainsi qu'une mise en réserve de l'azote qui sera mobilisé dès que la disponibilité en azote diminuera. A long terme, la mise en réserve est liée au développement de la plante et intervient à des stades physiologiques précis. Généralement, elle contribue au bon développement de la plante lorsque la demande en azote est particulièrement élevée (croissance des organes reproducteurs, repousse après une coupe...). Cette mise en réserve ne dépend pas de la disponibilité du sol mais entre en compétition avec l'utilisation directe de l'azote pour les organes en croissance (Monson *et al.*, 1994).

C.1.2 *Nature des réserves azotées*

Différentes formes de stockage de l'azote existent chez les plantes. Tout d'abord, dans le cas où la disponibilité en azote est supérieure aux besoins de la plante, l'azote peut être stocké dans les feuilles sous forme de nitrate. Cependant, l'accumulation de nitrate dans les feuilles aboutit à un déséquilibre osmotique ce qui limite cette forme de stockage de l'azote (Triboï-Blondel, 1988).

A l'opposé, la mise en réserve d'azote sous forme de protéines solubles permet à la plante de stocker de manière transitoire l'azote tout en préservant l'homéostasie cellulaire, même si ce stockage est plus coûteux d'un point de vue énergétique. Dans les feuilles, la mise en réserve protéique permet ainsi le maintien de la réduction du nitrate (Millard, 1988). Dans les tiges et les feuilles, l'azote peut être mis en réserve sous forme d'enzymes de l'appareil photosynthétique dont la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) qui constitue, quantitativement, la protéine soluble majeure des feuilles vertes. Dans les graines, les protéines de réserve (SSP pour Seed Storage Protein) fournissent à l'embryon l'azote nécessaire aux

Stade de développement
du colza

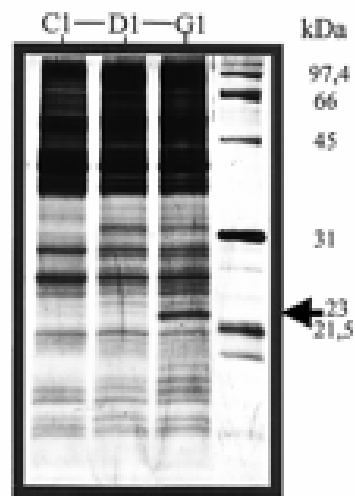


Figure I.12 : Evolution du profil électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines solubles du pivot de colza depuis la montaison (stade C1) jusqu'au début de la formation des siliques (stade G1). La flèche indique la VSP de 23 kDa. D'après Rossato *et al.*, 2001

premières étapes de la croissance qui précèdent l'acquisition de l'autotrophie pour l'azote. Les organes végétatifs peuvent également accumuler des protéines de réserve (VSP pour Vegetative Storage Protein). Les VSP ont été décrites initialement comme des protéines s'accumulant transitoirement en grande quantité dans les feuilles et les tiges de soja, avant d'être dégradées pour subvenir aux besoins nutritionnels des autres organes (Wittenbach, 1983 ; Staswick, 1988). Chez le colza, Rossato *et al.* (2001) ont mis en évidence l'accumulation puis la dégradation d'une VSP de 23 kDa dans le pivot (Figure I.12). La synthèse de cette protéine serait liée à l'azote rendu disponible lors de la sénescence foliaire, permettant ainsi son accumulation jusqu'à la fin de la floraison. En post-floraison, la VSP est hydrolysée et l'azote est remobilisé vers les siliques en développement. Cette protéine assure donc un rôle de stockage tampon entre les pertes en azote des feuilles sénescentes et le remplissage en azote des graines. L'utilisation d'anticorps anti-VSP 23 kDa a montré que cette protéine s'accumule également dans la tige et qu'une protéine homologue (24 kDa) s'accumule dans les feuilles et les inflorescences (Rossato *et al.*, 2002a).

C.1.3 Régulations de la mise en réserve

De nombreux facteurs peuvent influencer la mise en réserve de l'azote. Chez le soja, Staswick *et al.* (1991) ont montré que les VSP des feuilles, absentes lors d'une déficience en azote, étaient fortement accumulées lorsque la concentration en azote de la solution nutritive augmentait. Van Cleve et Appel (1993) ont confirmé ces résultats chez le peuplier et montré qu'en plus de la disponibilité en azote, les jours courts et les basses températures favorisaient l'accumulation de la protéine de stockage de l'écorce. L'effet des basses températures sur l'accumulation de la VSP dans le système racinaire et les stolons a également été observé chez le trèfle blanc (Bouchart *et al.*, 1998 ; Goulas *et al.*, 2001). Par contre, chez le colza, aucun effet d'une forte disponibilité en azote (1 à 50 mM de nitrate) n'a été observé sur l'accumulation de VSP dans le pivot (Rossato *et al.*, 2002a). L'effet de la nutrition azotée semble donc être plus prononcé sur les parties aériennes que souterraines.

Cependant, d'après Coleman *et al.* (1992, 1993), l'hydrolyse de la protéine de stockage de l'écorce de peuplier semble davantage liée à la demande en azote des organes en croissance. Ainsi, l'effet de l'héméropériode et de la disponibilité en azote sur l'accumulation de VSP serait en fait la conséquence d'une modification des relations sources-puits. Chez le soja, la suppression des gousses au fur et à mesure de leur apparition modifie les relations sources-puits au sein de la plante et induit une forte accumulation de protéines (VSP de 27, 29 et 94 kDa) dans les feuilles (Staswick, 1988 ; Tranbarger *et al.*, 1991 ; Stephenson *et al.*, 1998). Chez le colza, la

suppression de la moitié des feuilles de la rosette a conduit à une accumulation plus faible de la protéine de 23kDa du pivot mais à une dégradation relativement synchrone à celle des plantes témoins (Noquet *et al.*, 2004). La suppression de la tige du colza supprime l'accumulation de la VSP alors que l'ablation continue des inflorescences et des siliques conduit à une accumulation plus importante de la VSP, sans remobilisation ultérieure de celle-ci (Noquet *et al.*, 2004).

Enfin, de nombreuses études ont mis en évidence l'effet de différentes phytohormones sur la mise en réserve de l'azote. Un apport racinaire ou une pulvérisation foliaire d'acide abscissique, hormone impliquée dans de nombreuses réponses aux stress biotiques et abiotiques (sécheresse, froid, attaques pathogènes...), induit une accumulation de la VSP de 17,3 kDa chez le trèfle blanc (Goulas *et al.*, 2001). Chez le colza, l'application racinaire d'acide abscissique et l'application foliaire ou racinaire de méthyl-jasmonate (rôle signal dans les mécanismes de défense et de réponse à la blessure), induisent une accumulation de la VSP de 23 kDa (Rossato *et al.*, 2002b).

C.2 Remobilisation de l'azote

C.2.1 *Importance quantitative*

La remobilisation de l'azote à partir des organes végétatifs constitue une source d'azote importante pour le remplissage en azote des graines. Selon les espèces, l'absorption de nitrate au cours de la phase reproductrice est maintenue ou réduite, ce qui va influencer la contribution de la remobilisation dans le remplissage en azote des graines. Ainsi, chez le blé, 65 à 80% de l'azote des grains provient des parties aériennes, le reste de l'azote étant fourni par l'absorption post-floraison (Spiertz *et al.*, 1983). Chez le maïs, le grain à maturité contient environ 60% d'azote présent dans les parties aériennes avant la floraison (Crawford *et al.*, 1982). Chez le pois, 71% de l'azote total des graines provient de l'azote remobilisé à partir des organes végétatifs (Schiltz *et al.*, 2004) alors que chez le soja, la contribution de la remobilisation atteint 80 à 90% (Grandgirard, 2002). Chez le colza, dans le cas d'un arrêt de l'absorption lors de la floraison, la totalité de l'azote des graines provient de la remobilisation (Rossato *et al.*, 2001). Cependant, de nombreux travaux estiment plutôt à environ 70% la part d'azote provenant de la remobilisation et environ 30% de l'absorption post-floraison (Zhang *et al.*, 1991 ; Schjoerring *et al.* 1995 ; Hocking *et al.*, 1997 ; Malagoli *et al.*, 2005a).

ABSORPTION ET ALLOCATION > <

REMOBILISATION >

< REMOBILISATION >

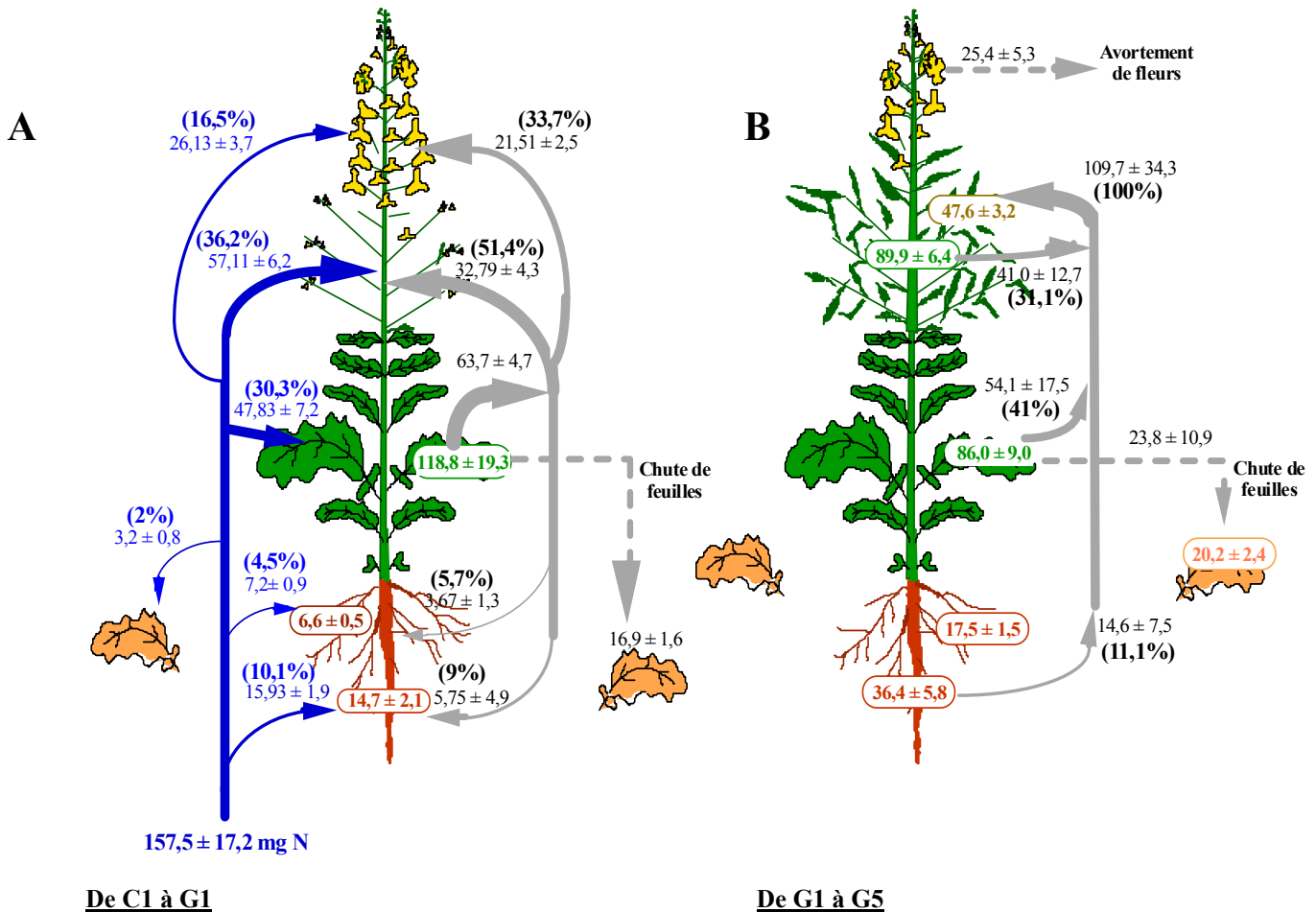


Figure I.13 : A) Bilan des transferts d'N endogène (flèches de droite) et exogène (flèches de gauche) en mg N.plante⁻¹ depuis la montaison (C1) jusqu'au début de formation des siliques (G1) puis jusqu'à la maturité (G5). Les chiffres entre parenthèses indiquent la répartition entre organes en % de l'azote endogène remobilisé à partir des feuilles vertes (à droite) ou en % de l'azote absorbé (à gauche). La quantité totale d'azote présent au sein de chaque organe au début de l'expérimentation (stade C1) est donnée dans les boîtes.

B) Bilan des transferts d'N total (absorbé et remobilisé) en mgN.plante⁻¹ au sein de la plante entre les stades G1 (début de la formation des siliques) et G5 (graines colorées). Les chiffres entre parenthèses indiquent la contribution de chaque organe au remplissage en azote total des siliques et des graines. Le contenu initial en azote total de chaque organe au stade G1 est donné dans les boîtes.. D'après Rossato *et al.* (2001).

Les sorties du modèle de répartition de l'azote chez le colza d'hiver, élaboré par Malagoli *et al.* (2005b), ont montré que les quantités d'azote remobilisé à partir des feuilles situées en bas de la canopée ainsi que la chronologie de la remobilisation de l'azote sont des variables importantes influençant l'accumulation de l'azote dans les siliques. Les simulations ont souligné que le rendement pourrait être amélioré de 15% en optimisant la remobilisation de l'azote à partir des organes végétatifs et en réduisant la teneur en azote résiduel dans les feuilles chutées.

C.2.2 Contribution des différents organes au remplissage des graines

Au cours de la phase végétative, et plus exactement entre la montaison et le début de la floraison, la remobilisation de l'azote issu des feuilles de colza se fait au profit du pivot, des racines et des tiges et représente environ 33,5% de l'azote total remobilisé à partir des feuilles (Rossato *et al.*, 2001, Figure I.13). Sur la même période d'étude au champ, Malagoli *et al.* (2005a) ont démontré que l'azote remobilisé à partir des feuilles et du pivot était principalement alloué aux tiges (86%) et aux inflorescences.

Au cours de la floraison, les inflorescences deviennent les seuls organes puits pour l'azote remobilisé qui est issu des feuilles (57%), de la tige (38%) et du pivot (5%, Malagoli *et al.*, 2005a).

Au cours du remplissage en azote des siliques, l'ensemble des organes végétatifs se comporte en sources d'azote, mais la contribution de chaque organe varie. Chez le colza, l'azote remobilisé provient essentiellement des feuilles et de la tige qui fournissent respectivement, 41 et 31,1% de l'azote total des siliques, alors que les inflorescences et le pivot contribuent à hauteur de 16,8 et 11,1% (Rossato *et al.*, 2001). Cependant, ces résultats résultent de l'absence d'absorption post-floraison. En conditions de plein champ, Schoerring *et al.* (1995) ont montré que les feuilles, la tige et les enveloppes des siliques contribuaient chacun approximativement à un tiers de l'azote total des graines. D'autres études ont confirmé le rôle majeur des feuilles et des tiges dans le remplissage en azote des graines qui contribuent respectivement à 36 et 34% de l'azote d'origine endogène des graines ; les inflorescences et le pivot contribuant respectivement à 22 et 8% (Malagoli *et al.*, 2005a). Des différences de fonctionnement des feuilles situées en bas (rangs foliaires 11 à 21) et en haut de la canopée (rangs foliaires 22 à 36) ont été mises en évidence par Malagoli *et al.* (2005,b), soulignant une remobilisation plus efficace des feuilles situées en haut de la canopée. Ces auteurs ont montré qu'une teneur en azote résiduel égale à 1% de la matière sèche dans les feuilles en bas de la canopée conduirait à une réduction des pertes d'azote vers l'environnement (-13 kg N ha^{-1}) et à une plus grande accumulation de l'azote dans les graines.

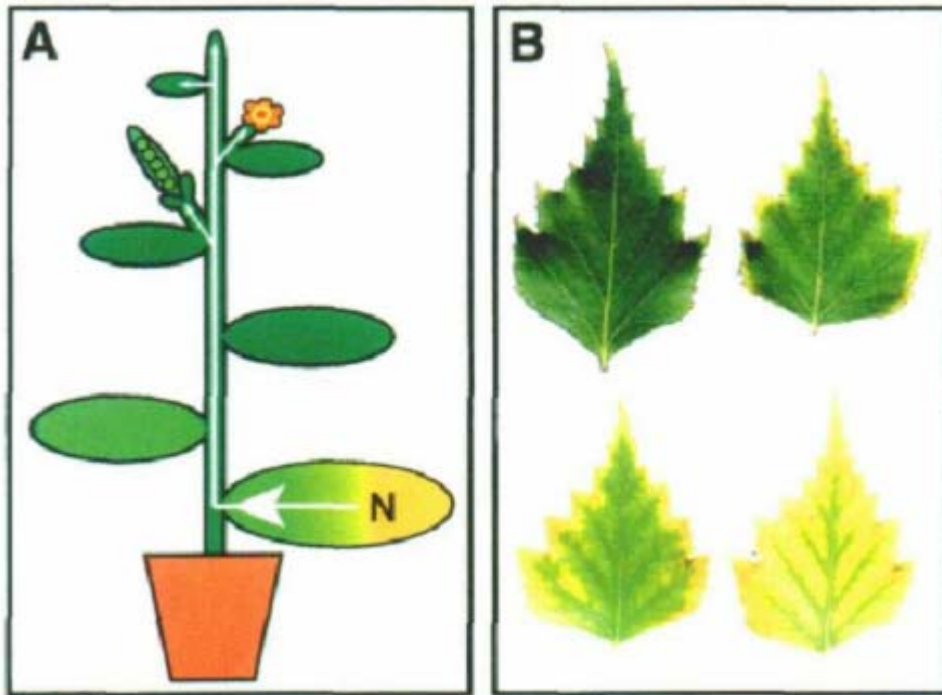


Figure I.14 : **A)** Illustration schématique du recyclage des nutriments (N) au cours de la sénescence foliaire, au profit des organes en croissance. **B)** Progression de la sénescence foliaire chez une espèce . La sénescence progresse des bords de la feuille vers le centre. Les cellules entourant les tissus vasculaires sénescent relativement tardivement afin de faciliter la remobilisation des nutriments des cellules sénescentes adjacentes. D'après Gan et Amasino (1997).

Chez le maïs, la contribution de la tige au remplissage des grains atteint 50% alors que celle des feuilles est de 20% (Crawford *et al.*, 1982). A l'opposé, chez le pois, le pool d'azote issu de la remobilisation provient majoritairement des feuilles (30%) et des cosses (20%) et de manière plus mineure des racines (11%) et des tiges (10%, Schiltz *et al.*, 2005). Récemment, une étude chez le pois chiche a montré que, selon les conditions de croissance, 37 à 72% de l'azote des feuilles et 12 à 56% de l'azote de la tige était remobilisé vers les graines (Soltani *et al.*, 2006).

C.3 Sénescence foliaire et remobilisation

C.3.1 *Définition et caractéristiques de la sénescence*

Dès 1938, Molisch (cité par Noodén, 1988) souligne que la dégénérescence conduisant à la mort de certaines parties de la plante est un processus normal du développement. Cette dégénérescence, ou sénescence, peut être définie comme la séquence des événements biochimiques et physiologiques qui se traduisent par la dégradation ordonnée des constituants cellulaires et par leur redistribution vers les tissus puits (Brouquisse, 1997), avec à terme, la mort de la cellule (Smart *et al.*, 1994). La cellule en sénescence a un rôle spécifique à jouer puisqu'elle transfère le maximum de nutriments vers d'autres parties de la plante, que ce soit pour le stockage ou pour la croissance de nouveaux organes (Buchanan-Wollaston et Morris, 2000, Figure I.14). Ainsi, chez *Arabidopsis*, plus de 80% de l'azote contenu dans les feuilles est exporté durant la sénescence (Himelblau et Amasino, 2001). D'une manière plus large, la sénescence peut être décrite à tous les niveaux d'organisation de la plante: au niveau cellulaire, tissulaire, de l'organe et enfin de celui de l'organisme entier (Leopold 1961, cité par Noodén, 1988) et à un temps donné dans la vie de la plante ; même si les conditions de croissance sont proches de l'optimum, elle est donc contrôlée génétiquement (Masclaux *et al.*, 2000). De plus, la sénescence peut être réversible. Certains traitements (lumière, hormones...) peuvent induire une sénescence foliaire partielle se traduisant visuellement par la dégradation des pigments chlorophyllien (jaunissement) ; donc des feuilles ayant mobilisé la grande majorité de leur contenu en nutriments peuvent « reverdir » (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999). La sénescence se déroule donc en deux phases. Une première phase, réversible, au cours de laquelle les cellules restent viables et une seconde phase, irréversible, qui conduit à la mort cellulaire (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis* et beaucoup d'autres plantes monocarpiques, quand ce stade est atteint, les feuilles présentent une dégradation totale des chlorophylles et une perte importante de teneur en eau.

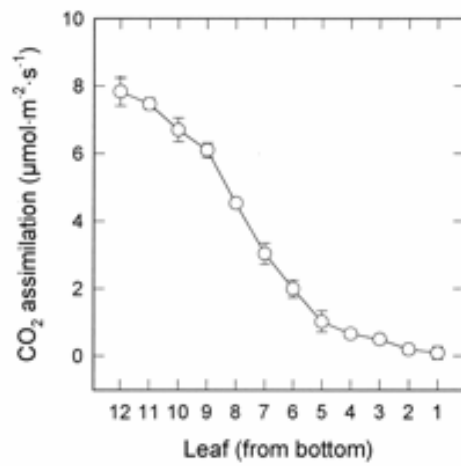


Figure I.15 : Taux de photosynthèse dans des feuilles d'âge différent (de la feuille 12, la plus jeune à la feuille 1, la plus âgée), chez des plantes de tabac. D'après Wingler *et al.* (1998).

Bien qu'étant un processus du développement, la sénescence peut être induite prématurément par les conditions environnementales. Deux types de sénescence sont donc distingués: la sénescence naturelle et la sénescence induite. La sénescence naturelle est régulée par l'âge, le développement des organes reproducteurs et le niveau des phytohormones. Quant à la sénescence induite, elle est provoquée par des contraintes environnementales telles que la carence nutritionnelle (en particulier azotée), l'obscurité, les attaques parasitaires, la sécheresse, l'ozone... Bien que les mécanismes physiologiques observés lors de ces deux types de sénescence (naturelle ou induite) soient fortement similaires, il semble que l'expression des gènes qui y sont associés soit plus ou moins spécifique du type de sénescence subie, de l'espèce végétale considérée, voire, pour la sénescence induite, de la nature de la contrainte (Lee *et al.*, 2001).

C.3.2 Mécanismes de la sénescence

La mise en place de la sénescence foliaire s'accompagne de nombreuses modifications physiologiques comme par exemple, la diminution progressive de l'activité photosynthétique ou encore une augmentation de la protéolyse. Parallèlement, la sénescence se traduit par des modifications de l'expression génique dont l'induction de gènes associés à la sénescence, les gènes SAG (Senescence-Associated Genes). Ces modifications de l'expression génique sont associées au maintien tardif de l'intégrité du noyau (Smart *et al.*, 1994). Contrairement à la photosynthèse, la respiration est maintenue de manière à fournir l'énergie nécessaire aux processus biosynthétiques pendant la sénescence. Les mitochondries sont donc fonctionnelles jusqu'au stade ultime de la sénescence.

➤ Perte de l'activité photosynthétique

Quel que soit le type de sénescence, la réduction de l'activité photosynthétique constitue le premier symptôme de sénescence (Figure I.15). La mobilisation de l'azote des protéines photosynthétiques comme la Rubisco entraîne un déclin de l'assimilation photosynthétique de dioxyde de carbone. Chez *Arabidopsis*, le taux de photosynthèse est réduit avant que les feuilles n'atteignent leur taille maximale alors que la teneur en chlorophylle reste élevée jusqu'à des stades tardifs de sénescence (Stessman *et al.*, 2002). Le catabolisme des chlorophylles s'accompagne d'une perte de la pigmentation foliaire mais lorsque le jaunissement de la feuille peut être perçu, la majorité des processus de sénescence ont déjà eu lieu. La voie de dégradation de la chlorophylle a été élucidée dernièrement (Matile *et al.*, 1996 ; Rodoni *et al.*, 1997 ; Matile *et al.*, 1999 ; Hörstensteiner et Feller, 2002). L'enzyme clef intervenant dans la voie semble être la *phéophorbide*

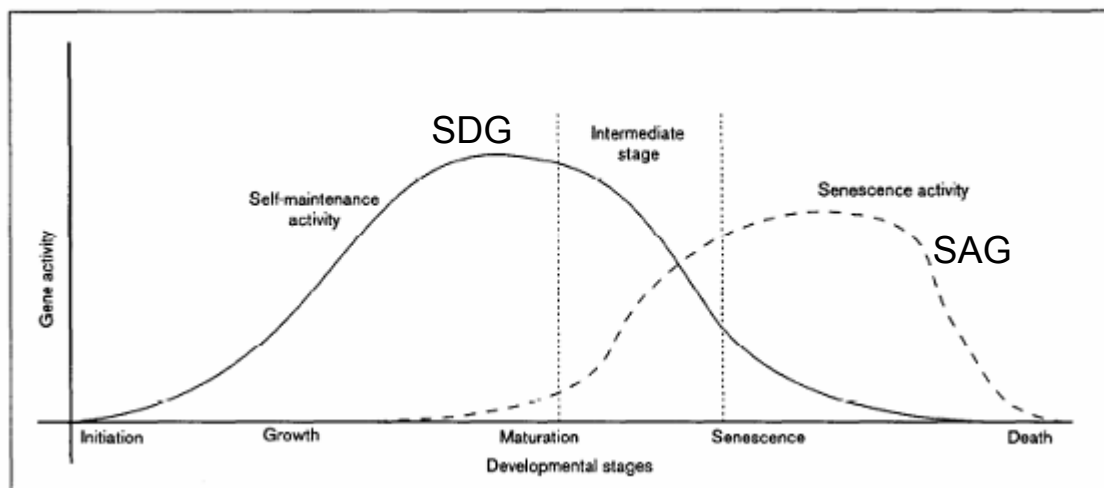


Figure I.16 : Profil d'expression des gènes au cours de la croissance et de la sénescence foliaire. Les gènes SDG (Senescence Down-regulated Gene) regroupent les gènes impliqués dans la photosynthèse, comme le gène Cab (Chlorophyll a/b-binding protein). L'expression des gènes SAG (Senescence Associated Genes) est induite au cours de la sénescence foliaire. D'après Nam (1997).

oxygénase a, responsable du clivage de l'anneau tetrapyrrole en catabolite de chlorophylle rouge (RCC pour Red Chlorophyll Catabolite ; Hörtensteiner *et al.*, 1998). Des mutants chez qui cette enzyme est inactive « restent verts » (mutants stay-green, Vicentini *et al.*, 1995). Chez les plantes sauvages, le niveau d'expression du gène codant la *phéophorbide oxygénase a* augmente très fortement durant la sénescence, ce qui laisse supposer son rôle majeur dans le contrôle de ce processus. Les produits finaux du catabolisme de la chlorophylle sont déposés dans la vacuole sans aucun recyclage de l'azote qu'ils contiennent (Hinder *et al.*, 1996 ; Tommasini *et al.*, 1998). Ainsi, les étapes de la dégradation de la chlorophylle, coûteuses en énergie, ne se déroulent pas dans le but de mobiliser des nutriments mais de manière à détoxifier les composés hautement réactifs libérés. En effet, l'absence d'une autre enzyme impliquée dans la dégradation de la chlorophylle, la *RCC réductase*, entraîne l'accumulation de produits de chlorophylle toxiques, comme le RCC qui conduit à la mort rapide de la cellule (Mach *et al.*, 2001).

➤ Modification de l'expression génique

Les acides nucléiques et en particulier les ARN constituent une source de phosphore dans une feuille mature (Thomas *et al.*, 2003), ce qui peut expliquer la chute rapide du niveau des ARN totaux avec l'avancement de la sénescence (Lohman *et al.*, 1994 ; Buchanan-Wollaston, 1994). Cependant, l'inactivation de certains gènes ne suffit pas à la mise en place de la sénescence. La sénescence est un processus actif qui nécessite l'expression de nouveaux gènes et la synthèse de nouvelles protéines (Noodén *et al.*, 1997). Effectivement, l'emploi d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN ou de protéines conduit à un retard de la sénescence (Gan et Amasino, 1997). Ainsi le niveau d'ARNm codant des protéines impliquées dans la photosynthèse chute au cours de la sénescence alors que le niveau d'ARNm codant des protéines impliquées dans le processus de sénescence augmente (Hensel *et al.*, 1993). A titre d'exemple, le gène *Cab*, codant une protéine de liaison à la chlorophylle a/b, est exprimé à un niveau élevé seulement dans les feuilles vertes, avec très peu d'ARNm présents dans les feuilles sénescentes (Buchanan-Wollaston, 1994).

Les gènes SAG (Senescence-Associated Genes) peuvent être définis comme des gènes dont l'expression augmente durant la sénescence foliaire naturelle par rapport aux autres stades de développement de la feuille (Nam, 1997, Figure I.16). Actuellement, plus de 40 gènes SAG ont été identifiés (Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997). Parmi ces gènes SAG, les gènes de classe I sont exclusivement exprimés lors de la sénescence alors que les gènes de classe II sont exprimés à un taux basal tout au long du développement foliaire, mais leur transcription augmente lors de la sénescence (Gan et Amasino, 1997). La majorité des gènes SAG codent des hydrolases telles que des ribonucléases, des protéases et des lipases ainsi que des protéines impliquées dans la

mobilisation des nutriments cellulaires comme par exemple la glutamine synthétase (GS). La GS est une enzyme clef de l'assimilation de l'ammonium chez les végétaux, dont l'isoforme GS1 (seule forme cytosolique induite chez *Brassica napus* lors de la sénescence foliaire) est activée et protégée de la dégradation par phosphorylation lors de la sénescence (Finneman et Schjoerring., 2000). D'autres gènes liés au stress sont également induits au cours de la sénescence, comme les gènes codant des métallothionéines, qui sont impliquées dans la chélation (*via* leurs résidus cystéine) des ions métalliques et des radicaux libres libérés lors de la dégradation des constituants cellulaires (Buchanan-Wollaston et Morris, 2000). De telles protéines protègent le statut redox de la cellule et maintiennent donc l'intégrité cellulaire nécessaire au bon déroulement de la sénescence (Buchanan-Wollaston, 1994). De plus, bien que tous ces gènes présentent une augmentation de leur expression au cours de la sénescence, l'augmentation de leur expression n'est pas simultanée (Buchanan-Wollaston et Morris, 2000). Par exemple, l'expression du gène *LSC54* (Leaf Senescence Clone 54) codant une métallothionéine, est plus précoce que celle du gène *SAG12* codant une protéase à cystéine (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

A ce jour, peu de gènes de classe I ont pu être identifiés comme spécifiques de la sénescence. Des études menées sur *Arabidopsis* par Northern Blot ont montré que parmi les gènes SAG, l'ARNm du gène *SAG12* atteint le plus haut niveau et qu'il est indétectable chez des feuilles non sénescentes (Lohman *et al.*, 1994). Le gène *SAG12* code une protéase à cystéine hautement spécifique de la sénescence, d'où son implication possible dans le turnover des protéines pendant la sénescence (Lohman *et al.*, 1994). Chez le colza, deux gènes homologues ont été caractérisés, *BnSAG12-1* et *BnSAG12-2* (Noh et Amasino, 1999). Le gène *BnSAG12-1* présente un haut niveau d'expression pendant la sénescence, tout comme le gène *SAG12* chez *Arabidopsis*, alors que l'expression du gène *BnSAG12-2* est beaucoup plus faible. La comparaison des séquences nucléotidiques indique que le gène *BnSAG12-1* est plus proche du gène *SAG12* que du gène *BnSAG12-2*, et que la divergence entre les deux gènes *BnSAG12* s'est faite avant celle entre *Arabidopsis* et *Brassica napus* (Noh et Amasino, 1999). Des études réalisées sur des tabacs transgéniques transformés avec la construction promoteur *SAG12*-gène rapporteur *GUS* ont montré que le promoteur *SAG12* est fonctionnel non seulement dans les feuilles sénescentes mais aussi dans les fleurs sénescentes et dans les cellules du phloème utilisées pour transporter les nutriments en dehors des feuilles sénescentes (Grbic, 2002).

➤ Protéolyse associée à la sénescence

Des mécanismes importants de protéolyse sont mis en place au cours du processus de sénescence impliquant la dégradation massive des protéines foliaires. Plus de 75% de l'azote

présent dans les feuilles est localisé dans les chloroplastes (Peoples et Dalling, 1988), qui sont les premiers organites à être dégradés. La Rubisco, protéine majeure de la feuille verte, constitue une réserve d'azote pendant l'expansion de la feuille, puis elle est fortement hydrolysée dès les premiers stades de sénescence foliaire (Feller et Fisher, 1994). La dégradation de la Rubisco est catalysée par deux protéases : l'une à cystéine et l'autre à sérine (Yoshida and Minamikawa, 1996). Par conséquent, la diminution de la capacité photosynthétique pendant la sénescence est due à la fois à la dégradation de la Rubisco et à celle de la chlorophylle (Wingler *et al.*, 1998).

Les chloroplastes sont capables de dégrader leurs protéines *via* des protéases internes mais les voies de dégradation plastidiales sont encore mal connues. L'une des protéases les plus importantes des chloroplastes, nommée ClpC/P, est une protéase homologue de la protéase dépendante de l'ATP ClpA/P présente chez *E.coli* (Maiurizi, 1992). Outre le complexe ClpC/P, les chloroplastes renferment des activités protéolytiques indépendantes de l'ATP. Ainsi, dans les feuilles et les racines, le profil des endo et exo-peptidases change considérablement pendant la sénescence (Feller et Fisher, 1994). Globalement, les activités des aminopeptidases diminuent au début de la sénescence alors que celles des carboxypeptidases se maintiennent plus longtemps, et que les activités des endopeptidases augmentent fortement au cours du processus (Feller et Fisher, 1994).

Les mécanismes de protéolyse durant la sénescence ne sont pas encore bien compris. Plusieurs auteurs ont évoqué l'implication du système protéasome-Ubiquitine (Ub) dans la sénescence, suggérée par l'augmentation de son activité et du niveau d'expression plus élevé des gènes codant les composés de la voie Ub (Garbarino *et al.*, 1995). Le fait que le protéasome 20S, aussi bien que le conjugué Ub, se maintienne à un niveau constant durant la sénescence indique que la voie protéasome-Ub reste fonctionnelle jusqu'aux étapes tardives de sénescence (Roberts *et al.*, 2002). La protéolyse dépendante de l'Ub semble être impliquée non seulement dans les processus de dégradation durant la sénescence foliaire mais également dans les mécanismes de régulation (Yoshida, 2003).

Le mécanisme par lequel la Rubisco est dégradée n'est toujours pas clair du fait qu'un système de protéolyse dépendant de l'Ub ne semble pas exister dans le chloroplaste. Il semblerait que les étapes initiales de sa dégradation se déroulent à l'intérieur des chloroplastes intacts, même si un rôle auxiliaire de la vacuole ne puisse être totalement écarté (Feller et Fisher, 1994). Il est également avancé qu'un régulateur négatif de la sénescence localisé en dehors des chloroplastes soit dégradé *via* la voie Ub, déclenchant alors les cascades de signaux qui vont conduire à la dégradation des protéines chloroplastiques (Yoshida, 2003).

C.3.3 Régulation de la sénescence

De nombreux facteurs internes (phytohormones...), aussi bien qu'externes (lumière, disponibilité en azote...), modulent la progression de la sénescence.

L'obscurité a longtemps été considérée comme un inducteur de la sénescence car une feuille isolée, placée à l'obscurité, entre en sénescence très rapidement (Weaver et Amasino, 2001). Cet ombrage de la feuille simule l'ombrage du bas du couvert par les feuilles apicales de la canopée. Dans ce cas, l'induction de la sénescence des feuilles ombrées permet le recyclage de l'azote vers les feuilles exposées à la lumière et augmente ainsi leur capacité photosynthétique (Schieving et Poorter, 1999). Les travaux de Rousseaux *et al.* (2000) ont montré que l'induction de la sénescence des feuilles basales d'une canopée dense de tournesol était due à un plus faible ratio entre la lumière rouge (R, $\lambda=665\text{nm}$) et le rouge lointain (FR, $\lambda=735\text{nm}$). La qualité de la lumière pourrait donc également être impliquée dans la régulation de la sénescence.

A l'opposé, si la plante entière est placée à l'obscurité, la sénescence des feuilles est retardée (Weaver et Amasino, 2001), et si elle est placée en lumière forte et en jours longs, la sénescence est accélérée (Noodén *et al.*, 1997). Ainsi, le statut en lumière du reste de la plante influence la progression de la sénescence de la feuille individuelle. L'effet de la photopériode semble davantage contrôler la sénescence par son effet sur l'initiation florale (Wingler *et al.*, 2006). De plus, en ombrant spécifiquement les jeunes feuilles de tournesol, Ono *et al.* (2001) ont observé une réduction de la teneur en sucres dans les feuilles âgées non-ombrées et un retard de sénescence. Ainsi, il semble que l'accumulation de sucres dans la feuille soit un des signaux inducteurs de la sénescence (Yoshida *et al.*, 2003 ; Wingler *et al.*, 2006). Cependant, les raisons de cette accumulation en sucres alors que l'assimilation photosynthétique de carbone est réduite reste à éclaircir.

Une faible disponibilité en azote ou une carence en azote induit la sénescence (Ono *et al.*, 1996 ; Crafts-Brandner *et al.*, 1998). De plus, des plantes cultivées sur de faibles niveaux d'azote présentent une plus forte accumulation de sucres que des plantes cultivées sur un niveau élevé d'azote (Pourtau *et al.*, 2004). La carence azotée pourrait ainsi conduire à une plus forte accumulation en sucres en diminuant la demande de squelettes carbonés pour les synthèses d'acides aminés et protéines (Wingler *et al.*, 2006). Par ailleurs, la croissance de plantes d'*Arabidopsis* sur un milieu contenant du glucose induit des gènes de la remobilisation d'azote qui sont induits lors de la sénescence du développement comme les gènes de la glutamine synthetase (*GLN1 ;4* ; Pourtau *et al.*, 2006).

Ainsi, d'un point de vue physiologique, une sénescence foliaire précoce serait due à un déséquilibre du ratio carbone/azote (disponibilité en azote faible ou disponibilité en sucres élevée) et se traduirait

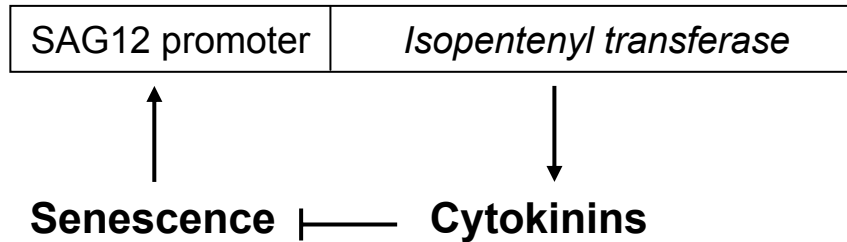


Figure I.17 : Schéma de la construction entre le promoteur du gène SAG12 (spécifique de la sénescence) et la partie codante du gène d l'isopentényl transférase, enzyme clé de la biosynthèse des cytokinines. D'après Gan et Amasino, (1997).

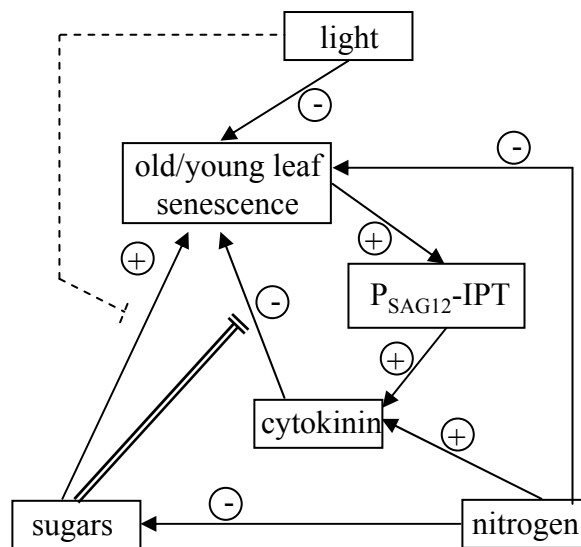


Figure I.18 : Modèle de la régulation de la sénescence par les cytokinines, l'azote, les sucres et la lumière. (-), inhibition; (+), induction; (==), inhibition totale; (----), inhibition partielle. D'après Gan et Amasino, (1997); Wingler *et al.* (1998) et Jordi *et al.* (2000).

par la réduction de la capacité photosynthétique de la plante. A l'opposé, une sénescence foliaire tardive interférerait avec la remobilisation des nutriments. Cette plasticité dans la chronologie des évènements de la sénescence permet l'adaptation de la plante aux conditions de croissance tout en maintenant le bilan carboné global (Wingler *et al.*, 2006).

Plusieurs interactions entre les phytohormones et le signal sucre ont été décrites. Il existe notamment un contrôle hormonal *via* les cytokinines et l'éthylène (Gan et Amasino, 1997). Les cytokinines sont impliquées dans la mise en place des phases précoces de la sénescence. Des tabacs transgéniques transformés avec la construction promoteur SAG12-gène IPT (Isopentényl transférase, enzyme clé de la biosynthèse des cytokinines) présentent un retard de la sénescence foliaire (Gan et Amasino, 1995, 1997 ; Jordi *et al.*, 2000, Figure I.17). A l'inverse des plantes sauvages, ces plantes allouent préférentiellement l'azote vers les feuilles âgées plutôt que vers les jeunes feuilles (Jordi *et al.*, 2000). Récemment, Balibrea *et al.* (2004) ont montré que l'action des cytokinines lors de la sénescence foliaire, implique l'activité des invertases extracellulaires. L'éthylène est, quant à lui, un modulateur de la sénescence ; sa présence accélère le processus de sénescence mais n'est pas nécessaire pour que le phénomène se mette en place (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). L'acide jasmonique et son dérivé ester méthylique, le méthyl-jasmonate jouent le rôle de signal dans les mécanismes de défense et induisent la sénescence foliaire (Rossato *et al.*, 2002b). L'application exogène d'acide abscissique, hormone inductible par le stress osmotique, induit la sénescence foliaire (Yang *et al.*, 2003). Cependant, plutôt que d'être retardée, la sénescence foliaire de plantes déficientes en acide abscissique (mutants *aba*) est accélérée, probablement en raison d'une plus grande sensibilité au stress osmotique (Pourtau *et al.*, 2004). La sénescence foliaire apparaît donc comme un phénomène complexe, finement régulé, mais dont les voies de signalisation sont encore mal connues à ce jour (Figure I.18).

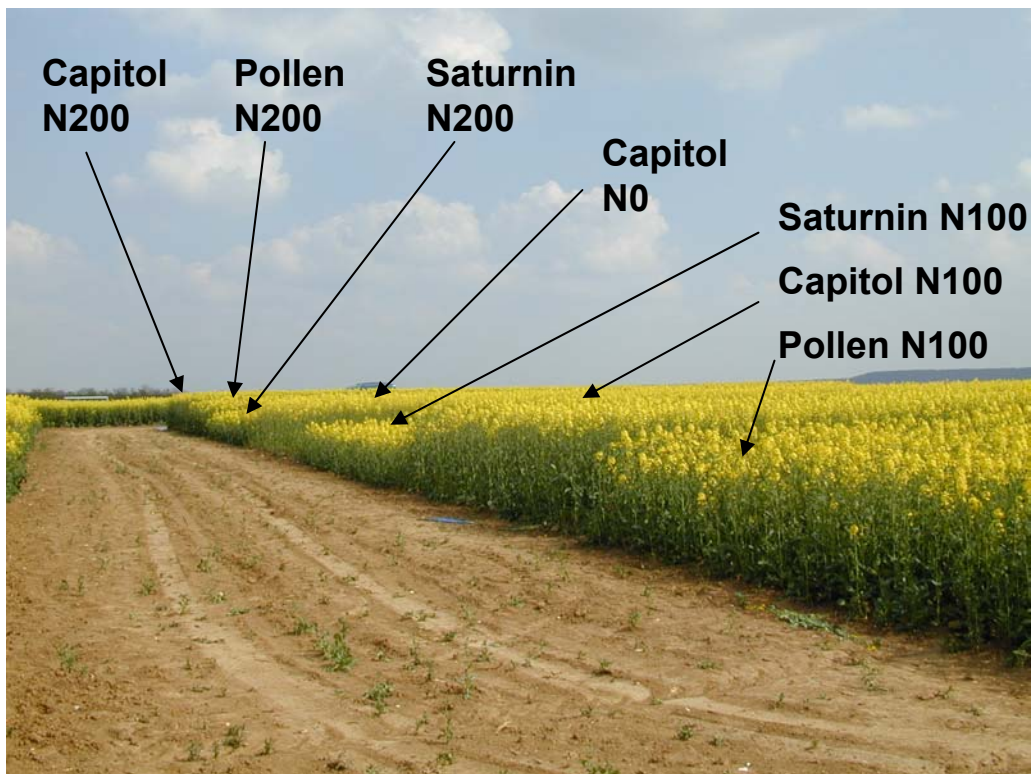


Figure I.19: Dispositif expérimental Grignon Avril 2004.

D Conclusions et objectifs de recherche

L'analyse bibliographique a souligné l'importance du colza dans l'agriculture d'aujourd'hui ainsi que la nécessité de rendre cette culture davantage respectueuse de l'environnement. De manière à réduire la fertilisation azotée sans affecter le rendement grainier et sa qualité, le travail de la sélection sera de choisir des plantes particulièrement efficaces vis-à-vis de l'azote. Quelques études sur le colza se sont intéressées aux dynamiques de l'azote exogène et endogène au cours du développement de la plante (Rossato *et al.*, 2001 ; Malagoli *et al.*, 2005a,b) mais, à ce jour, aucun travail ne relate l'effet du génotype et de la fertilisation azotée sur ces dynamiques de prélèvement et de répartition de l'azote. L'objectif principal de mon travail de thèse était donc d'étudier les dynamiques d'absorption, de distribution et de remobilisation de l'azote, depuis la reprise de végétation jusqu'à la récolte, chez trois génotypes de colza (Capitol, Pollen, Saturnin), soumis à deux (ou trois) niveaux de fertilisation azotée (0), 100, 200 kg N ha⁻¹ (Figure I.19). Étant donné la contribution des feuilles pour le remplissage en azote des graines (environ un tiers) mais également les importantes pertes d'azote par voie foliaire (jusqu'à 100 kg N ha⁻¹), une attention particulière a été apportée à la remobilisation de l'azote des feuilles liée à la sénescence.

Mon travail de thèse peut se décomposer en 3 projets :

- le projet 1 concerne l'absorption de l'azote. Dans un premier temps, il s'agit de comparer l'accumulation de l'azote des trois génotypes ainsi que la réponse de chaque génotype à la fertilisation azotée, de manière à mettre en évidence une capacité d'absorption du nitrate différente, ou non, selon les génotypes. De plus, la réduction de l'absorption de nitrate lors de la floraison suggérée par de nombreux travaux, est étudiée. Si une telle diminution est observée, la pluviométrie sera analysée et l'intensité d'un potentiel stress hydrique estimée *via* l'estimation de la discrimination ¹³C. Compte tenu de la répartition régulière de la pluviométrie, la discrimination ¹³C n'a finalement pas été réalisée. Dans un second temps, le marquage au K¹⁵NO₃, réalisé de la reprise de végétation à la récolte, nous permet de suivre l'allocation de l'azote absorbé dans les différents tissus et de comparer la gestion de l'azote absorbé selon le niveau de fertilisation azotée et le génotype.

- le projet 2 traite du recyclage de l'azote. Il s'agit d'étudier la variabilité génotypique et environnementale de la remobilisation de l'azote. L'azote remobilisé à partir de chaque tissu est calculé par la différence entre l'azote total et l'azote issu de l'absorption de ce tissu. Ainsi, la

capacité de remobilisation des trois génotypes et l'effet de la fertilisation azotée sur la remobilisation de l'azote sont abordés. La participation relative de l'azote absorbé et de l'azote issu de la remobilisation dans le remplissage en azote des siliques est également estimée. Les feuilles chutées sont récoltées en fonction de leur position nodale de manière (i) à mettre en évidence des capacités de remobilisation différentes selon la position de la feuille et (ii) de relier ces différences de remobilisation à l'environnement lumineux de chaque feuille.

- le projet 3 aborde les aspects moléculaires de la sénescence foliaire afin de mettre en évidence des bio-indicateurs (biochimiques et moléculaires) de la sénescence foliaire qui, comparativement à des indicateurs physiologiques, pourraient rendre de la progression spatio-temporelle de la sénescence chez le colza. Ces bio-indicateurs sont étudiés sur un modèle simple (rosette de colza) puis validés sur plante entière. L'objectif est, à terme, d'utiliser ces bio-indicateurs comme des outils permettant d'évaluer la variabilité génotypique et environnementale (fertilisation azotée et lumière) de la sénescence foliaire chez le colza, depuis la reprise de végétation jusqu'à la récolte.

Chapitre II

Chapitre II. Nitrogen Dynamics in Field Grown Winter Oilseed Rape. I. Effect of Contrasted Nitrogen Fertilizations.

Running title: Effect of N fertilization on N dynamics in oilseed rape

Julie GOMBERT¹, Frédéric LE DILY^{1*}, Philippe ETIENNE¹, Laurence ROSSATO², Jean-Michel ALLIRAND³, Alexandra JULLIEN³, Alexandre SAVIN³ et Alain OURRY¹

1 – UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S. Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

2 – Centre for Mined Land Rehabilitation, The University of Queensland, Brisbane, Queensland 4072, Australia

3 – UMR INRA-INA PG Environnement et Grandes Cultures, 78850 Thiverval Grignon, France

* – Corresponding author, E-mail: frederik.ledily@unicaen.fr

Soumis à Annals of Botany

KEY WORDS: *Brassica napus* L., nitrogen, N uptake, N remobilization, N partitioning, ¹⁵N labelling, oilseed rape.

RESUME :

➤ **Contexte et objectifs** L'efficacité de l'azote (NUE pour Nitrogen Use Efficiency) du colza est faible en raison d'une remobilisation non optimale de l'azote des organes végétatifs (majoritairement les feuilles) vers les organes en croissance. Cette culture nécessite donc des niveaux élevés de fertilisation azotée et les feuilles chutent avec des teneurs en azote importantes. Afin de réduire le niveau de fertilisation azotée et d'améliorer l'impact environnemental du colza sans affecter le rendement grainier, une meilleure compréhension des dynamiques d'absorption, de répartition et de remobilisation de l'azote au sein de la plante est nécessaire. Ce travail a donc été conduit pour étudier l'effet de fertilisations azotées contrastées sur ces dynamiques de l'azote en condition de plein champ.

➤ **Méthodes** L'expérimentation a été conduite sur un colza d'hiver cultivé au champ sous trois niveaux de fertilisation azotée (0, 100 et 200 kg N ha⁻¹). Les plantes ont été récoltées fréquemment depuis la reprise de végétation (Stade de Développement SD 2,4) jusqu'à la maturité (SD 9,9) en utilisant une technique de marquage ¹⁵N de manière à distinguer, dans chaque tissu, l'azote issu de l'absorption de celui provenant de la remobilisation.

➤ **Résultats clés** L'effet de la fertilisation azotée se traduit par une augmentation de l'accumulation de l'azote et une répartition différente de l'azote absorbé. Quel que soit le niveau de fertilisation azotée, une réduction de l'absorption de l'azote est observée au cours de la floraison, et une forte absorption post floraison est remarquée chez les plantes recevant 200 kg N ha⁻¹. Indépendamment du traitement azoté, l'azote contenu dans les siliques à maturité est principalement issu de la remobilisation de l'azote des tissus végétatifs, les feuilles vertes et les tiges constituant les sources majeures d'azote remobilisé. La chronologie de la remobilisation de l'azote à partir des différents organes végétatifs ainsi que sa contribution relative au remplissage en azote des siliques sont affectés par la fertilisation azotée. L'efficacité de remobilisation de l'azote des feuilles augmente avec la fertilisation azotée, selon un gradient axial depuis les feuilles basales vers les feuilles apicales.

➤ **Conclusion** Une meilleure synchronisation entre la remobilisation de l'azote foliaire et le remplissage en azote des graines pourrait améliorer le NUE du colza ; la possibilité d'exploiter la variabilité génotypique pour améliorer cette synchronisation reste à éclaircir.

ABSTRACT

➤ **Background and Aims** The nitrogen use efficiency (NUE) of oilseed rape is weak due to a relatively low N remobilization from vegetative (mostly leaves) to growing parts of the plant. Thus, this crop requires high rate of N fertilization and leaves fall with high N content. In order to reduce the rate of N fertilization and to improve the environmental impact of oilseed rape without decreasing yield, it is crucial to better understand the dynamics of N through the plant. The present investigation was therefore realized to study the effect of contrasted N fertilizations on the dynamics of N uptake, partitioning and remobilization under field conditions.

➤ **Methods** The experiment was conducted in a field-grown winter oilseed rape under three levels of N dose (0, 100 and 200 kg N ha⁻¹). Plants were sampled frequently from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) by using a ¹⁵N labelling technique in order to distinguish in each tissue N coming from uptake or remobilization.

➤ **Key Results** N fertilization increased N accumulation and affected the partitioning of N taken up. Irrespective of N dose, N uptake was decreasing during flowering and an important post-flowering N uptake was observed in plants receiving 200 kg N ha⁻¹. Whatever the N treatment, the major part of N in pods came from N remobilization of vegetative tissues, green leaves and stems being the main sources of remobilized N. The timing and the contribution of N remobilized from different vegetative organs depended on the N supply. The efficiency of N remobilization in leaves increased irrespective of the N treatment and along an axial gradient from the basal to the uppermost leaves.

➤ **Conclusion** Better synchronising leaf N remobilization and N grain filling could improve the NUE of oilseed rape, whether genotypic variation could be exploited to achieve such a goal remains unknown.

A Introduction

Because of its use in a variety of purposes (oil, alternative fuel, animal food...), the interest for winter oilseed rape increases in Europe and in the whole world. Moreover, winter oilseed rape is an excellent rotation crop for cereals as it helps to disrupt the cycle of soil-born pathogens (Kirkegaard *et al.*, 1997) and due to its high capacity for uptake of soil mineral nitrogen (Laine *et al.*, 1993), it is considered as a catch crop to reduce nitrate leaching during the autumn-winter period.

In tobacco, it has been suggested that high nitrogen (N) use efficiency (NUE: ratio of harvested N to N fertilization) results of highly coordinated timing of N distribution to the locations of greatest N demand within the plant (Masclaux *et al.*, 2000). Several works on oilseed rape have showed that N uptake increases from bolting to the start of the flowering, whereas little N uptake is observed during pod filling (Merrien *et al.*, 1988; Schjoerring *et al.*, 1995; Gabrielle *et al.*, 1998; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2005). Consequently, whereas most of carbohydrates are provided by photosynthesis (Wardlaw, 1990), the major fraction of pod N is derived from remobilization of N previously accumulated in vegetative organs and in particular leaves (Dreccer *et al.*, 2000; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005). The efficiency with which N is transferred from vegetative organs to growing pods varies according to the organs (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005). Although leaves mostly fulfil the N demand of pods, the high N content of fallen leaves undergoes an unfinished N remobilization. This is why, despite a high nitrate uptake capacity, the NUE of oilseed rape is weak. Leaf fall is of considerable interest because N remaining in prematurely fallen leaves is a loss for dry matter production but also may increase nitrate leaching following the mineralization of leaf organic N. The return of N to the soil can reach 100 kg N ha⁻¹, even if the crop can take up a small part of it in spring (Dejoux *et al.*, 2000). As a consequence of its low NUE, oilseed rape requires high rate of N fertilization (Holmes, 1980) making its environmental impact potentially negative.

The positive impact of N on biomass production and yield of oilseed rape has been repeatedly reported (Wright *et al.*, 1988; Bilsborrow *et al.*, 1993; Schjoerring *et al.*, 1995; Hocking *et al.*, 1997; Dreccer *et al.*, 2000; Leleu *et al.*, 2000; Chamorro *et al.*, 2002; Barlog and Grzebisz, 2004; Rathke *et al.*, 2005). Depending on site conditions, optimum seed yield occurs in the range of 180 to 220 kg N ha⁻¹ (Jackson, 2000). Due to economic and environmental reasons,

today's challenge lies in maintaining yield using the minimum possible level of N fertilization. This challenge could be met with the development of N efficient genotypes and the improvement of crop N management.

The main effects of increasing N status in *Brassica napus* have been shown to increase leaf number and area (Allen and Morgan, 1972; Wright *et al.*, 1988; Gammelvind *et al.*, 1996; Leleu *et al.*, 2000; Svecnjak and Rengel, 2006), leaf chlorophyll content (Ogunlela *et al.*, 1989) and pod number and area (Allen and Morgan, 1972; Taylor *et al.*, 1991; Gammelvind *et al.*, 1996; Hocking *et al.*, 1997; Leleu *et al.*, 2000). As for this crop N uptake mostly occurred prior to the pod development, yield response of oilseed rape to N fertilizer will depend, in part, on the capacity of the crop to remobilize N from senescing vegetative organs and to transfer this N to developing seeds.

Although numerous studies on oilseed rape have been reported in the literature, physiologic mechanisms explaining the efficiency of N dynamics remain unclear. Based on a ^{15}N labelling, N flows within the plant have been determined during the growth cycle of oilseed rape by Rossato *et al* (2001) and Malagoli *et al* (2005). Both studies concerned one genotype under one level of N fertilization and showed that about 70% of the total N in pods derived from N remobilization from vegetative organs with a massive contribution of leaves and stems. The present investigation was therefore conducted to study the effect of contrasted N fertilizations on the dynamics of N uptake, partitioning and remobilization in a field-grown winter oilseed rape under three levels of N dose (0, 100 and 200 kg N ha⁻¹). Plants were sampled every third week from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) and a ^{15}N labelling technique was used in order to distinguish in each tissue, N derived from uptake or remobilization. Plants of the different N treatments were also compared on the characteristics of their fallen leaves. Fallen leaves were collected very carefully in order to evaluate the residual N according to the leaf rank. Amounts of lost N from stem extension to maturity were also calculated.

The present paper investigates the impact of N fertilization on the N dynamics while a companion paper describes the effect of genotypes, in interaction with different levels of N fertilization.

B Materials and methods

B.1 Experimental site

The field experiment was conducted in Grignon (Paris Basin, France) in the growing season of 2004. The preceding crop was winter barley. A winter oilseed crop (*Brassica napus* L. cv. Capitol) was sown on a loamy soil on the 27th of August, at the density of 71 plants per m² and with a row spacing of 17,5cm. Potassium and phosphorus were applied in an amount of 100 kg ha⁻¹ on the 3rd of September. Sulphur was applied in an amount of 75 kg ha⁻¹ on the 24th of February.

B.2 Experimental treatments, labelling and sampling

Three treatments were defined: N0, N100 and N200 receiving 0, 100 and 200 kg N ha⁻¹, respectively. N fertilizer was applied as NH₄NO₃. The N200 treatment was splitted as 100 kg N ha⁻¹ on the 15th of September while both N100 and N200 treatments were given 40 kg N ha⁻¹ on the 24th of February and 62 kg N ha⁻¹ on the 16th of March.

The ¹⁵N labelling experiment was performed from stem extension (GS 2,4) to seed maturity (GS 9,9) according to the methodology used by Malagoli *et al* (2005). One week before each harvest date, 6 plants of each treatment and at the same developmental stage were selected inside the canopy. Then, 750ml of labelled N (1mM K¹⁵NO₃, ¹⁵N excess = 10%) was carefully applied around each plant, at the soil surface (about 400 cm²). Seven days after ¹⁵N labelling, plants were harvested. The petiole of each senescing leaf was attached to the stem by a nylon thread in order to collect the fallen leaves later on, according to their position on the axis of the plant.

Plants were harvested every third week from the 4th of March until final harvest on the 8th of July. At each sampling, plants were separated into the following 6 fractions: taproot, green and fallen leaves, stems (main stem and axillary's racemes), flowers and pods. Because flowers and lateral roots constitute organs difficult to quantitatively study in field conditions, roots were omitted for further analysis and flowers were only taken into account for total plant N amount. Immediately after the fractionation, fresh weight (FW) and total surface area of leaves were measured and dry matter (DM) was determined after drying at 80°C for 48 h.

In field conditions, the choice of individual plant in the canopy is extremely difficult. During the stem extension, the choice of the plants was made with the help of two mean criteria: the plant's size and the taproot diameter. However, these criteria appeared to be not sufficient after flowering and the chosen plants were larger than the mean plant obtained at the meter square

scale. This is why the experimental data of dry weight in each tissue were corrected to obtain values of an average plant by using a correction ration calculated as the mean of the four following ones:

$\frac{\text{Mean plant dry weight}}{\text{Individual plant dry weight}}$	$\frac{\text{Mean plant leaf area index}}{\text{Individual plant leaf area index}}$
$\frac{\text{Mean plant taproot diameter}}{\text{Individual plant taproot diameter}}$	$\frac{\text{Mean plant seed dry weight}}{\text{Individual plant seed dry weight}}$

This index was calculated at each harvest date and for each level of N fertilization.

Time was expressed in cumulative degree days after sowing ($^{\circ}\text{C DAS}$), using 4°C as the base temperature and the stages in development were determined according to the growth stage identification key of oilseed rape by Sylvester-Bradley and Makepeace (1984).

B.3 Chemical analysis and calculation of N fluxes

The plant material was ground to a fine powder for isotopic analysis. The total N and ^{15}N in the plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy).

Total N amount of a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

$$N_{\text{tot } i,t} = \%N_{i,t} \times DM_{i,t}$$

N uptake was estimated by the difference of the plant N amount between two harvest times, *ie* three weeks. Excess ^{15}N in each tissue combined with total plant N uptake obtained previously, allowed to calculate the partitioning of N taken up. Based on the following assumptions, i) unlabelled N from the soil was taken up and allocated in different plant tissues similarly to labelled N, ii) N uptake and allocation observed in one week was similar during the two weeks before, then N uptake by each tissue was calculated as:

$$N_{\text{uptake } i,t} = \frac{(N_{\text{tot } t} - N_{\text{tot } t-3 \text{ weeks}}) \times {}^{15}\text{N excess in i tissue}}{\text{total } {}^{15}\text{N excess in plant}}$$

With $N_{\text{tot } t}$: total N in plant at time “t” (*ie* one week after the application of ^{15}N fertilizer).

$N_{\text{tot } t-3 \text{ weeks}}$: total N in plant three weeks before

At each harvest, the amount of N mobilized from or to each tissue was calculated by subtracting the total N amount (N_t) from the N derived from uptake and the previous N amount found in this tissue three weeks before, according to the following equation:

$$N \text{ mob}_{i,t} = N_{i,t} - N_{i,t-3 \text{ weeks}} - N \text{ uptake}_{i,t}$$

Therefore, positive values of N mobilized represent N that is mobilized to this tissue, while negative values correspond to a net mobilization of N from this tissue.

B.4 Indexes of N use efficiency

Apparent N remobilization efficiency (NRE) was calculated without the use of ^{15}N data, according to the following equation:

$$\text{Apparent NRE (\%)} = \frac{N \text{ veg}_{\text{flowering}} - N \text{ veg}_{\text{maturity}}}{N \text{ veg}_{\text{flowering}}} \times 100$$

With $N \text{ veg}_{\text{flowering}}$ the N amount in the vegetative plant parts at flowering (A, Figure II.6A) and $N \text{ veg}_{\text{maturity}}$ the N amount in the vegetative plant parts at maturity (B, Figure II.6A). (Apparent NRE is equal to $([A-B]/A) \times 100$, see Figure II.6A).

Real N remobilization efficiency corresponds to the amount of N in pods coming from N remobilization of vegetative tissues estimated by ^{15}N labelling and was calculated as:

$$\text{Real NRE (\%)} = \frac{\text{Pod N derived from N remobilization}}{\text{Pool of remobilized N}} \times 100$$

N translocation efficiency (NTE) was calculated as:

$$\text{NTE (\%)} = \frac{\text{Pod N derived from N uptake}}{\text{Total N taken up after flowering}} \times 100$$

N Harvest Index (NHI) was calculated according to the following equation:

$$\text{NHI (\%)} = \frac{\text{Seed N at maturity}}{\text{Shoot N at maturity}} \times 100$$

NHI was also calculated with the N in fallen leaves incorporated to the shoot N (NHI +FL).

N utilization efficiency (NUtE) for yield production was calculated as:

$$\text{NUtE} = \frac{\text{Seed dry weight at maturity}}{\text{Shoot N at maturity}} \quad (\text{kg kg}^{-1} \text{ N})$$

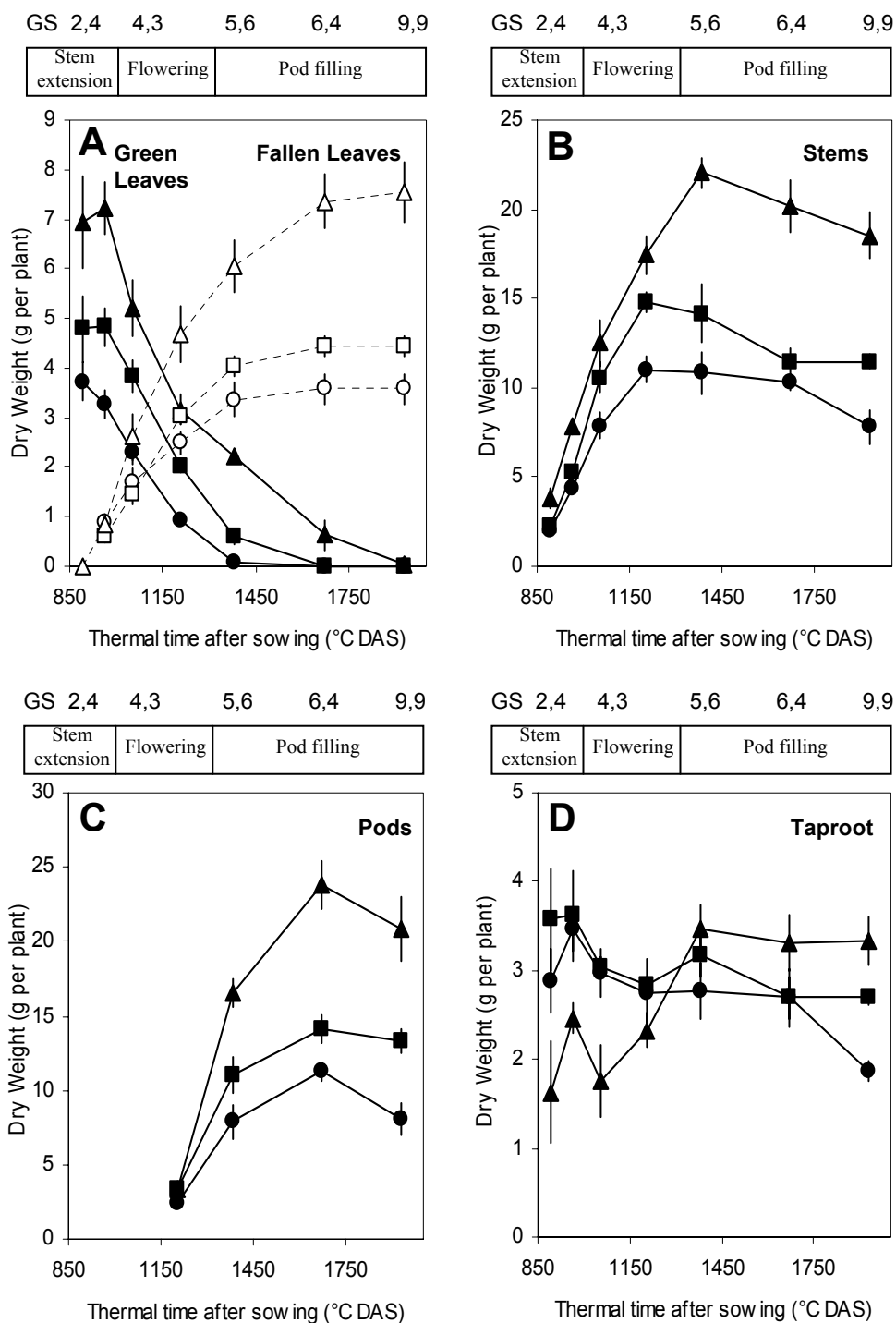


Figure II.1: Effect of N application rate on the thermal time course of biomass in field-grown *Brassica napus* 'Capitol' plants separated into leaves (A), stems (B), pods (C) and taproot (D), from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9). Leaf biomass (A) was separated into green leaves (filled symbol) and cumulative fallen leaves (open symbols). (●, ○) 0 kg N ha⁻¹, (■, □) 100 kg N ha⁻¹ and (▲, △) 200 kg N ha⁻¹. Note the different scale. Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

B.5 Statistical analysis

All experiments were performed with 6 individual plants. The resulting variation in the measurements was expressed as the mean \pm SD for $n=6$. Statistical analyses were performed using Minitab. After having checked the normality of the data (Anderson-Darling test, 95%) and the equality of the variances (Bartlett test, 95%), treatment and genotype effects were tested by ANOVA (GLM) and the significance of differences was estimated using the Tukey test (95%). When data did not realize the parametric test conditions, the non parametric test of Kruskal Wallis was applied followed by Tukey or Mood median test (95%) to compare means or medians.

C Results

The experiment was conducted under field conditions starting at stem extension (GS 2,4) at 897°C days after sowing (DAS) and ending at maturity (GS 9,9) at 1927°C DAS and at three levels of N fertilization (0, 100 and 200 kg N ha⁻¹, respectively called N0, N100 and N200).

C.1 Dry matter production

Dry matter production was increased by N supply (Figure II.1). At the beginning of the experiment, green leaves represented the main organ (corresponding to 47%, 50% and 61% of the total biomass of N0, N100 and N200 plants, respectively). Green leaves dry weights were maximal and then, decreased with respect to the increase of the fallen leaves cumulative dry weight (Figure II.1A). For a given treatment, the total leaf biomass (green and fallen leaves) remained approximately constant during the studied period. Despite the development of new photosynthetic leaves at the top of the plant and on the lateral branches, the total biomass of green leaves declined due to the fall of the largest basal leaves. Whatever the N treatment, approximately two third of the leaves were already fallen at the beginning of pod development (GS 5,4).

At stem extension (GS 2,4), similar stems dry weights were observed in N0 and N100 plants and lightly higher in N200 plants (Figure II.1B). This was followed by a rapid increase explained by the growth of the main stem but also by the extension of lateral branches. When growth was ended, a maximal dry weight was reached and remained relatively constant thereafter (N0) or slightly decreasing (N100 and N200) until maturity. A longer growth of stems was observed in N200 plants, until around 1400 °C DAS, compared to N0 and N100 plants which reached a maximal dry weight before 1200 °C DAS.

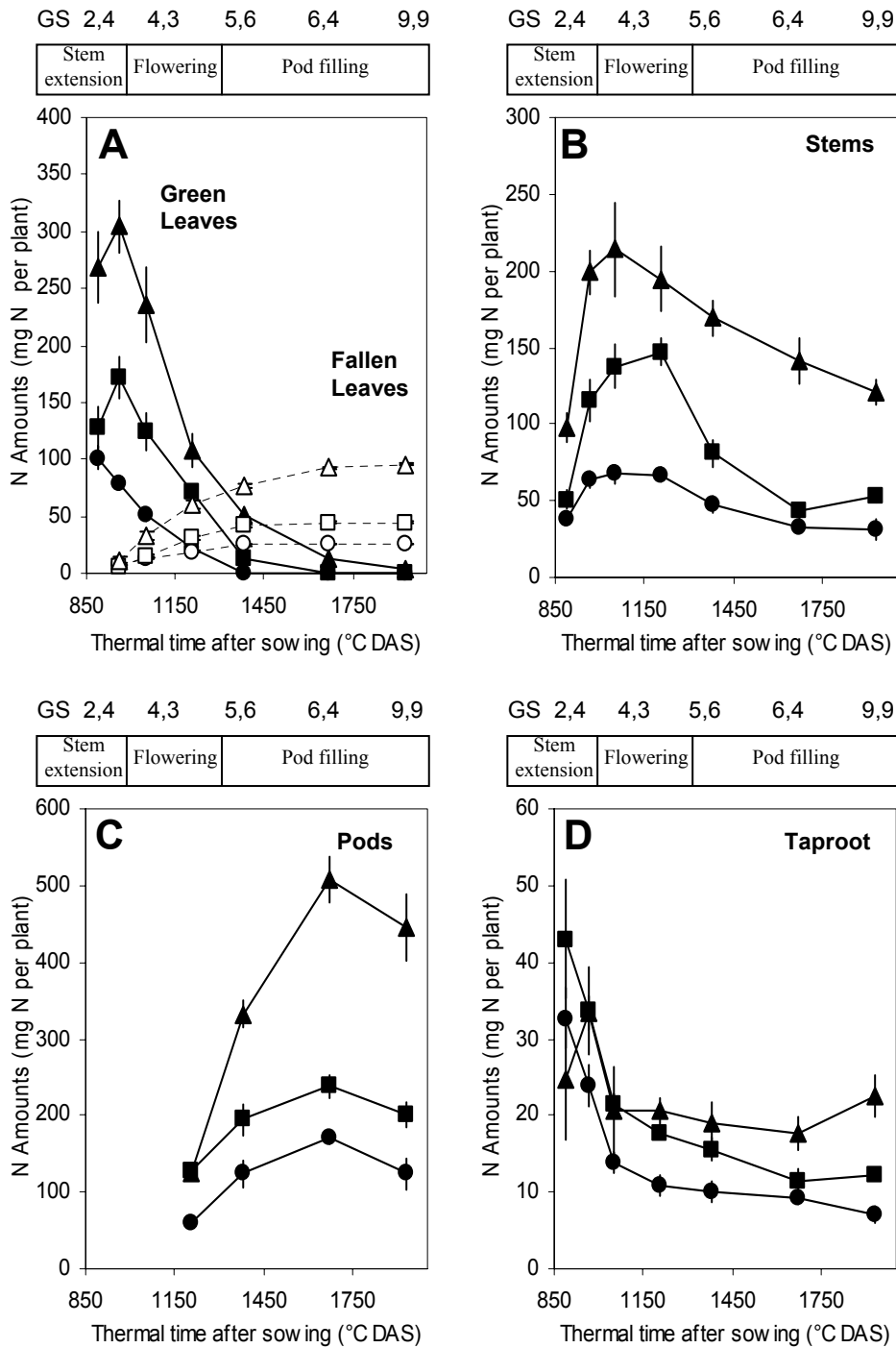


Figure II.2: Effect of N application rate on the thermal time course of total nitrogen amount in field-grown *Brassica napus* 'Capitol' plants separated into leaves (A), stems (B), pods (C) and taproot (D), from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9). Leaf N amount (A) was separated into green leaves (filled symbol) and cumulative fallen leaves (open symbols). (●, ○) 0 kg N ha⁻¹, (■, □) 100 kg N ha⁻¹ and (▲, △) 200 kg N ha⁻¹. Note the different scale. Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

Pod development started around this time (Figure II.1C). Pod biomass progressively increased until harvest, at a slower rate from N200 to N0. Final pod dry weight was increased with the N dose and pods represented the major organ separated into seeds and pod walls corresponding approximately to 55% and 45%, respectively, whatever the N treatment (data not shown).

The taproot growth differed with N level (Figure II.1D). At the beginning of the experiment, the taproot dry weight was around twice higher in N0 and N100 plants than in N200 plants which were the only ones that have received N fertilization during autumn. N100 taproot dry weight remained constant throughout plant development, whereas N0 slightly decreased before maturity and N200 reached its maximal value around 1450 °C DAS until maturity.

C.2 N accumulation and mobilization

The time course of N accumulation and mobilization from different organs varied with the N dose. At the beginning of the experiment (GS 2,4), the green leaves were the most important sink organs for N (Figure II.2A). Green leaves N amounts rapidly decreased during flowering (GS 4,3) and only a part of this N was recovered in the fallen leaves, suggesting that the major part of leaf N was mobilized to the growing organs. The N contained in the fallen leaves corresponded to 26.1, 26.0 and 35.5 % of the maximal green leaves N amount of N0, N100 and N200 plants, respectively.

The rate of N accumulation in stems depended on the N supply but reached a maximum value during flowering (GS 4,3) independently to the N supply (Figure II.2B). The maximal N amount in stems was relatively low in N0 plants (less than 70 mg N per plant) compared to N100 and N200 plants (147 and 213 mg N per plant, respectively). Whatever the N treatment, the mobilization of N from the stems began with the development of the reproductive organs and carried on until maturity.

From the beginning of their development, pods displayed a rapid N accumulation, as they constituted the most active sink for N (Figure II.2C). At maturity, the pod N amount depended on the N dose but whatever the N treatment, pods represented by far the most important N compartment of the plant. At harvest, seeds N amounts reached 111,4 mg, 179,1 mg and 392,5 mg N plant⁻¹, respectively, in N0, N100 and N200 plants (data not shown). Then, seeds contained the largest N amounts of the plant, corresponding to about 89% of the final N amount of the plant, whatever the N treatment.

The taproot amounts of N highly decreased between 850 and 1150 °C DAS indicating that N mobilization was occurring (Figure II.2D) and remained thereafter around a constant value

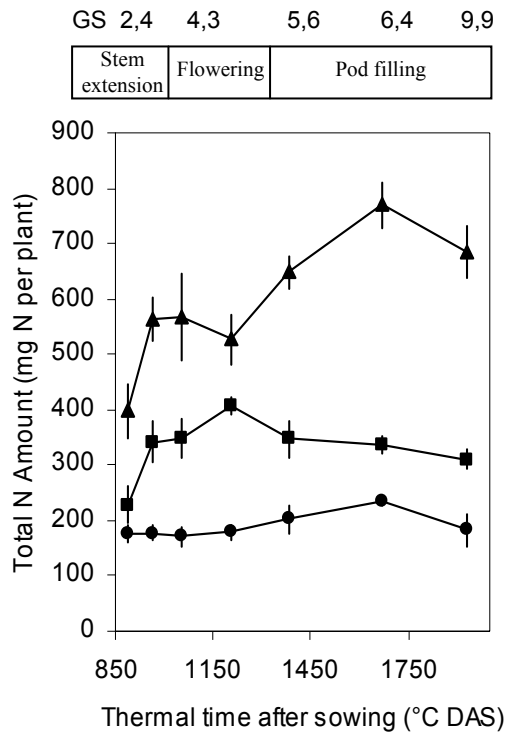


Figure II.3: Effect of N application rate on the thermal time course of N uptake (estimated from N amount in the plant and taking into account fallen leaves) in field-grown *Brassica napus* ‘Capitol’ plants from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9). (●) 0 kg N ha⁻¹, (■) 100 kg N ha⁻¹ and (▲) 200 kg N ha⁻¹. Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

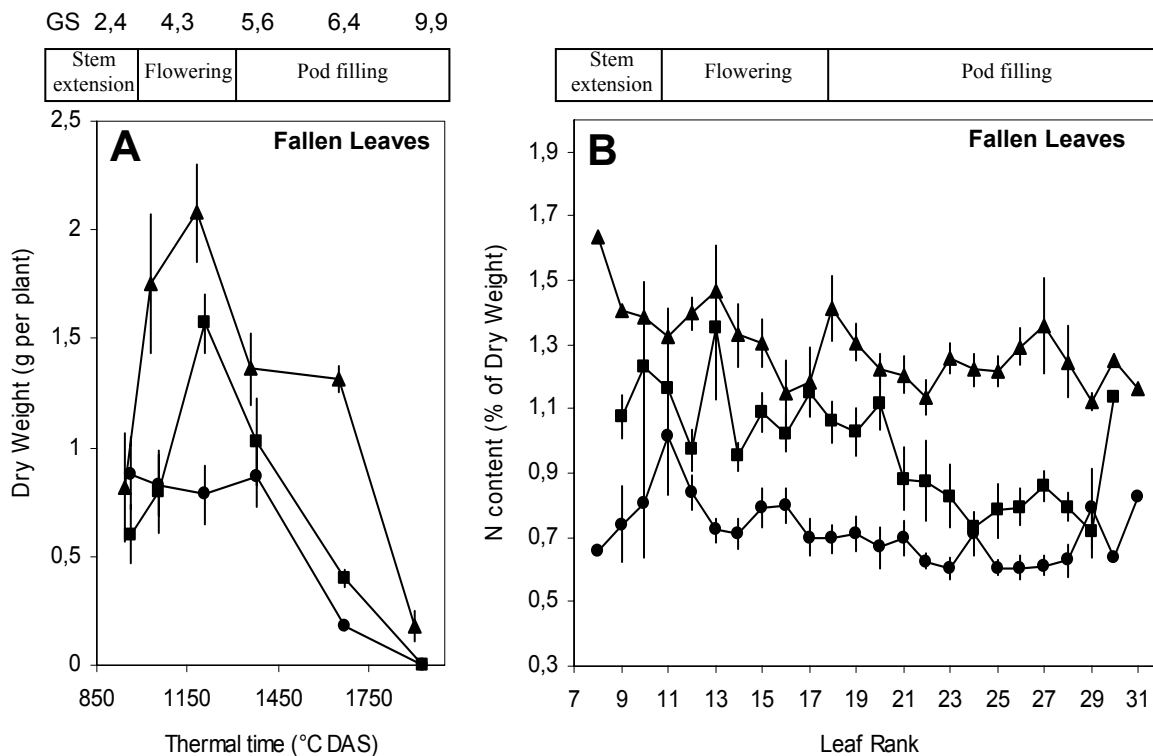


Figure II.4: Biomass (A) and total N content (B) pattern of fallen leaves from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) in field-grown *Brassica napus* ‘Capitol’ under three levels of N fertilization: (●) 0 kg N ha⁻¹, (■) 100 kg N ha⁻¹ and (▲) 200 kg N ha⁻¹. Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

depending on the N supply (around 10, 15 and 20 mg N per plant in N0, N100 and N200 plants, respectively).

The pattern of total N accumulation in whole plant varied with the N supply (Figure II.3). The final N amount was approximately doubled between each N treatment (180, 310 and 650 mg N per plant, respectively, for N0, N100 and N200 plants). At the beginning of the experiment, no significant N accumulation was observed for N0 plants while a slight N accumulation occurred before maturity, but however insignificant. Contrary to N0, the N uptake by N100 and N200 plants was elevated during stem extension before slowing down during flowering (GS 4,3). Whereas no N uptake was observed in N100 plants during pod filling, N200 plants displayed a high N accumulation during this period.

C.3 Loss of nitrogen by leaf fall

Green leaves were individually attached to the stem, allowing fallen leaves to be accurately sampled at each harvest (i.e. every third weeks) according to their leaf rank on the terminal as well as on the axillary's racemes. Thus, the dry matter and N content patterns in fallen leaves was monitored under field conditions from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9).

The time course of the fallen leaves dry weight varied with the N dose (Figure II.4A). A peak of fallen leaves was reached at 1150°C DAS for N100 and N200 plants (1.5 and 2 g per plant, respectively) while the fallen leaves dry weight of N0 plants remained constant around 0.8 g per plant until 1400°C DAS and greatly decreased thereafter indicating the fall of the last leaves of the apical part of the plant.

The effect of N fertilization was also markedly observed on the residual N content of the fallen leaves (Figure II.4B), underlying a better efficiency of leaf N remobilization affected by the N dose. N0 and N200 leaves fell with a N content around 0.7 and 1.4% whatever their leaf rank, respectively, whereas N100 leaves showed a spatial gradient of residual N content. A higher N content was observed in the basal leaves compared to the uppermost leaves (respectively 1.1% and 0.9%), underlying a better efficiency of N remobilization of uppermost leaves which fell later than the basal ones, i.e. during the pod development. From stem extension to maturity, the cumulated amounts of N lost by leaf fall reached 15.0, 26.8 and 41.1 kg N ha⁻¹ respectively in plots receiving 0, 100 and 200 kg N ha⁻¹.

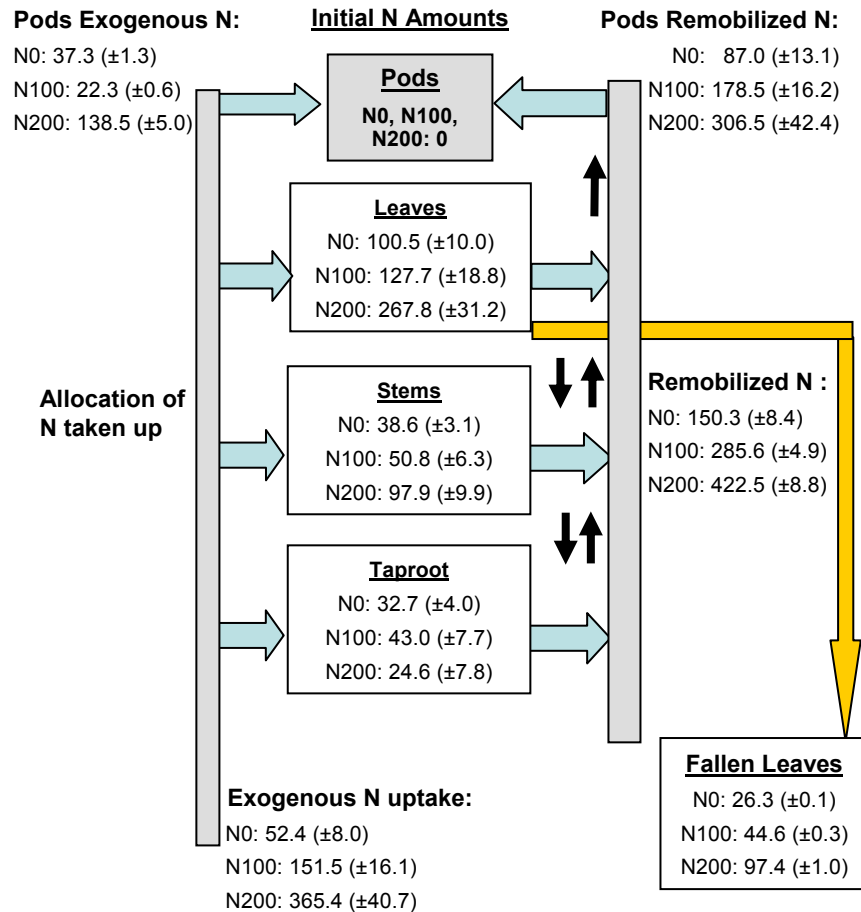


Figure II.5: Overview of N dynamics in field-grown *Brassica napus* 'Capitol' from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) under three levels of N fertilization: N0 (0 kg N ha⁻¹), N100 (100 kg N ha⁻¹) and N200 (200 kg N ha⁻¹). N amounts are expressed in mg N plant⁻¹ and each value is given as the mean ± standard deviation for n=6.

C.4 N Dynamics

The flow chart (Figure II.5) represents the partitioning of N (taken up and remobilized) through the major organs of the plant (pods, green leaves, stems and taproot) from stem extension to maturity. By ^{15}N labelling, it was possible to quantify the partitioning of the N taken up during the plant development.

Exogenous N supply

The amount of total N taken up increased with the rate of N fertilization (52.4, 151.5 and 365.4 mg N plant⁻¹ respectively for N0, N100 and N200 plants) (Figure II.5) and the partitioning of the exogenous N greatly varied with the N dose (Table II.1). For example, the N taken up of N0 plants was mostly allocated to the pods (71.2% of the total N taken up) compared to stems, taproot and leaves (20%, 6.1% and 1.3%, respectively). In a different way, N100 plants allocated most of the N taken up to the stems and leaves (38.7% and 35.2%, respectively) and N200 plants to the pods and stems (37.9% and 35.8%, respectively). These different patterns of N allocation are linked to the time course of N uptake. The N uptake of N100 plants mostly occurred during the stem extension whereas the N uptake was observed during pod formation in N0 and N200 plants (see above, Figure II.3).

Remobilization of endogenous N from vegetative organs

The amount of total remobilized N from vegetative organs greatly increased with the N supply (150.3, 285.6 and 422.5 mg N plant⁻¹ in N0, N100 and N200 plants, respectively) (Figure II.5). Leaves and stems were the main source of remobilized N whatever the N dose, providing respectively around 50% and 35% of the remobilized N pool (Table II.1). Taproot displayed a decreasing contribution with N dose (from 19.2% to 7.4%).

Contribution of N taken up and remobilized to the final N amount of pods

The final N amount in pods (“N taken up” and “remobilized N”) was greatly increased with the N dose (134.3, 200.8 and 445 mg N plant⁻¹ in N0, N100 and N200 plants, respectively, table II.1). Despite the different proportions of N taken up and remobilized in pods of N0 and N200 plants (Table II.1), the contribution (%) of exogenous and remobilized N to pod N was similar between N0 and N200 plants (Figure II.5). For these N treatments, approximately 70% of the pod N amount came from N remobilization and 30% from N uptake. Because of the specific N uptake time course of N100 plants (Figure II.3), the relative contribution of exogenous N declined to 11% and was compensated by a high N remobilization from vegetative organs to pods.

Table II.1: Total amounts of N taken up and remobilized and their relative proportion in pods, Green leaves, stems and taproot from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) in field-grown *Brassica napus* ‘Capitol’ under 3 levels of N fertilization: N0 (0 kg N ha⁻¹), N100 (100 kg N ha⁻¹) and N200 (200 kg N ha⁻¹). A positive N remobilization (+) represents N amount coming into an organ while a negative one (-) represents N amount coming out of an organ. Nitrogen amounts are expressed in mg N plant⁻¹ and each value is given as the mean of 6 individual plants.

N fertilization rate	Tissues	Allocation of N taken up	% of total N taken up	Remobilized N	% of total remobilized N
N0	Pods	37.3	71.2	+87.0	+57.9
N100	Pods	22.3	14.7	+178.5	+62.5
N200	Pods	138.5	37.9	+306.5	+72.5
N0	Leaves	0.7	1.3	-74.9	-49.8
N100	Leaves	53.4	35.2	-136.5	-47.8
N200	Leaves	69.9	19.1	-242.0	-57.3
N0	Stems	10.5	20.0	-46.3	-30.8
N100	Stems	58.7	38.7	-109.5	-38.3
N200	Stems	130.8	35.8	-149.2	-35.3
N0	Taproot	3.2	6.1	-28.8	-19.2
N100	Taproot	7.8	5.1	-39.5	-13.8
N200	Taproot	19.1	5.2	-31.3	-7.4

C.5 N indexes

The apparent N remobilization efficiency (NRE) informs on the amount of N remobilized from vegetative organs to pods by comparing the N amounts of the vegetative organs (including fallen leaves) at flowering (Figure II.6A, arrow A) and at maturity (Figure II.6A, arrow B). Thus, approximately 65-69% of the N contained in vegetative organs of N0 and N100 at flowering was remobilized to pods whereas in N200 plants, the apparent NRE was lower (around 57%, Figure II.6B).

The real NRE is calculated on the basis of ^{15}N labelling data, which allows to precisely distinguish endogenous and exogenous N of each organ and corresponds to the percentage of N in pods coming from N remobilization related to the pool of total remobilized N. Thus, the real NRE takes into account the whole N remobilization from vegetative tissues (leaves, stems and taproot). The real NRE increased with the N supply from 57.9% in N0 to 72.5% in N200 plants (Figure II.6B), underlying a higher proportion of remobilized N allocated to pods with increasing N supplies.

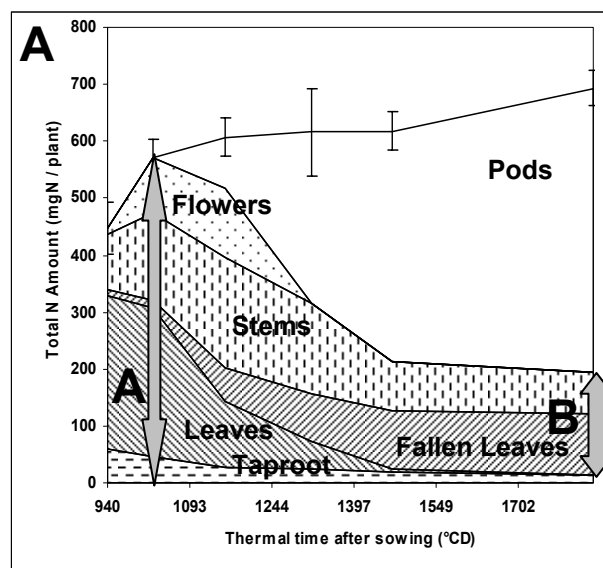
The N translocation efficiency (NTE) represents the part (%) of N taken up directly allocated to the pods (Figure II.6B). The highest NTE was found in N0 plants (73,1%) and the lowest in N100 plants (52.4%). The low NTE in N100 plants was the consequence of the extremely low amount of N uptake after flowering. Inversely to the real NRE, N200 plants displayed a lower NTE (65.6%) than N0 plants.

The N Harvest Index (NHI) represents the amount of N in seeds compared to aboveground biomass at maturity. The NHI only slightly declined with increasing N supply from 72.1% in N0 plants to 68.8% in N200 plants (Figure II.6C). When the N amount lost by fallen leaves was taken into account (NHI +FL), the NHI was reduced of approximately 10% whatever the N treatment.

The N Utilization efficiency (NUtE) represents the seed dry matter production per unit of N taken up by shoot. The NUtE declined with increasing N supplies from 29.6 in N0 plants to 20.1 in N200 plants (Figure II.6C).

D Discussion

The aim of the present work was to study the effect of contrasted N fertilizations on the dynamics of N uptake, partitioning and remobilization in a field-grown winter oilseed rape under three levels of N supply (0, 100 and 200 kg N ha⁻¹).



B	Apparent NRE	Real NRE	NTE
N0	64.6% ±5.1	57.9% ±13.7	73.1% ±4.5
N100	68.8% ±1.2	62.5% ±5.7	52.4% ±1.5
N200	57.1% ±2.0	72.5% ±10.0	65.6% ±2.6

C	NHI	NHI (+ FL)	NUtE
N0	72.1% ±1.9	61.2% ±1.1	29.6 ±1.2
N100	70.4% ±1.7	59.7% ±1.8	27.4 ±0.9
N200	68.8% ±1.9	58.8% ±2.2	20.1 ±1.3

Figure II.6: Effect of N application on apparent and real N remobilization efficiencies (NRE), N translocation efficiency (NTE), N Harvest Index (NHI), N harvest Index taking into account the fallen leaves (NHI +FL) and N utilization efficiency (NUtE), in field-grown *Brassica napus* ‘Capitol’ under three levels of N fertilization: N0 (0 kg N ha⁻¹), N100 (100 kg N ha⁻¹) and N200 (200 kg N ha⁻¹). Data are means ± standard deviation for n=6. See ‘Materials and Methods’ for calculations.

D.1 N Uptake

The total N amount per plant (Figure II.3) revealed a positive effect of N fertilization on the pattern of total N uptake. Furthermore, the allocation of N taken up was also affected by N treatment. Thus, due to N deficiency, more than 70% of N taken up by N0 plants was allocated to the pods. By contrast, N200 plants allocated approximately the same amount of N taken up to the stems and pods.

However, N uptake slowed down during flowering irrespective of the N treatment. Several studies on oilseed rape reported a decline or even a stop of N uptake during flowering (Merrien *et al.*, 1988; Schjoerring *et al.*, 1995; Gabrielle *et al.*, 1998; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2005). Flowering is the most critical period influencing the yield of oilseed rape. The final number of seeds and pods is determined during a four week period and depends on the availability of assimilates, i.e. the relation between source and sink (Evans, 1984; Keiller and Morgan, 1988; Leterme, 1988). It is however interesting to observe a post-flowering N uptake in N200 plants. This result supports the idea (Schjoerring *et al.*, 1995; Hocking *et al.*, 1997; Barlog and Grzebisz, 2004; Malagoli *et al.*, 2005) that shoot N content may increase after flowering. Nevertheless, adding N during grain filling has a limited impact on yield because pod and seed density reach their final value shortly after flowering (Habekotte, 1993). The fact that no N uptake occurred in N100 after flowering remains unclear. Environmental factors such as water stress or nitrate concentration in soil cannot be implicated, as they were similar in N100 and N200 plants during this period (data not shown).

In our study, the decline of N uptake during flowering could be linked to the drastic decline of the leaf area indice (LAI) that decreased of more than 50% during flowering, whatever the N treatment (data not shown). This decrease of LAI reflects the massive leaf fall, which is mainly due to shading by the flowers and later by the pods (Gabrielle *et al.*, 1998). Thus, the LAI greatly decreases whereas the pod area index (PAI) slowly increases (Diepenbrock, 2000). Before flowering, the leaves and the others vegetative organs constitute a large sink for N. At the onset of flowering, they become a source for N and pods are not yet present. Thus the N demand becomes weaker than the N offer. This unbalance between N source and sink may lead to the decrease of N uptake and also to the fall of leaves with a relatively high residual N content. By contrast, the plant requires a large amount of N during grain filling and it could be suggested that this high demand in N stimulates the post-flowering N uptake.

D.2 N Remobilization

N remobilization from vegetative tissues highly contributes to protein synthesis in the seeds and more seed N is derived from remobilization during grain filling in oilseed rape than in wheat (Dreccer *et al.*, 2000). In our experiment, about 70% of the pod N amount in N0 and N200 plants came from N remobilization and 88% in N100 plants, for which post-flowering N uptake was nil (Figure II.5).

The apparent rate of N remobilization from leaves (70% whatever the N treatment, calculated from Figure II.2A) was similar to that reported by Zhang *et al* (1991), Hocking *et al* (1997) and Malagoli *et al* (2005). Furthermore, green leaves accounted for the largest source of remobilized N (about 50% of the pool of remobilized N), irrespective of the N dose (Table II.1). The works of Rossato *et al* (2001) and Malagoli *et al* (2004) showed that N remobilized from green leaves and stems accounts for approximately 36-41% and 31-34% of pod N, respectively. We also demonstrated that N remobilization from taproot depended on the rate of N fertilization with an increasing contribution of the taproot from 7.4% in N200 plants to 19.2% in N0 plants (Table II.1). Schjoerring *et al* (1995) reported that leaves, stems and pod walls each contribute about one third of the final seed N content in high N plants. Several studies revealed a high N remobilization from pod walls to seeds (Schjoerring *et al.*, 1995; Dreccer *et al.*, 2000). Moreover, the N apparent mobilization of pods of axillary's racemes is twice lower than pods of the main stem (Barlog and Grzebisz, 2004). Our field experiment was by far too complex (three N treatments and three genotypes, see companion paper) to distinguish seeds and pod walls but it would have been interesting to compare the effect of N treatment on N remobilization from pod walls.

It is also relevant to note that whatever the N treatment, N remobilization from the different vegetative organs occurred at different stages of plant development. So, leaf N was mainly remobilized during flowering whereas N remobilization from the stems occurred later, as previously reported (Hocking *et al.*, 1997; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005). The asynchrony between leaf N remobilization and pod development is partly overbalanced by N storage buffer organs such as stems and taproot (Rossato *et al.*, 2001). With more than 70% of the N of pods coming from remobilization, N remobilization seemed to be efficient. Nevertheless, oilseed rape is usually source limited for pod growth and yield (Pechan and Morgan, 1985; Wright *et al.*, 1988) and increasingly source limited from low to high N supply (Dreccer *et al.*, 2000). Pod growth appears to be limited by N remobilization from source organs (leaves, stems and pod walls), particularly at sub-optimum N supply (Schjoerring *et al.*, 1995). The challenge would be to better synchronize N remobilization from vegetative organs, in

particular leaves, during grain filling. This could be achieved if leaves stayed longer on the plant during flowering and pod filling. N remobilization would increase with the development of pods. Thus, more N would be available for grain filling and leaves would fall with a lesser N content.

D.3 Fallen leaves

Whatever the N treatment, the cumulative dry biomass of the fallen leaves at the end of the experiment reached the value of green leaves biomass at the beginning of the experiment (Figure II.1A). This shows that our method consisting in attaching leaves before they fell and sampling them every third week allows a good estimation of the fallen leaves dry weight from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9).

The major part of the leaves fell before pod development irrespective of the N dose (Figure II.1A). However, N200 plants displayed a longer green leaves pattern compared to N0 and N100 plants (Figure II.4A). N deficiency leads the plant having tight N economy to sustain the complete development of pods. Thus, leaf senescence is accelerated and leaves are shorted-lived due to N remobilization to growing organs (Leleu *et al.*, 2000; Brouquisse *et al.*, 2001; Gombert *et al.*, 2006; Svecnjak and Rengel, 2006). By contrast, high N supply leads to a higher number of leaves and stems and delays leaf senescence (Leleu *et al.*, 2000; Brouquisse *et al.*, 2001).

The N content of the fallen leaves increased with the N supply and followed a declining gradient from the basal to the uppermost leaves in N100 as well as in N200 plants (Figure II.4B). This result suggests that there is a better synchronization between the senescence of the uppermost leaves and the pod filling, making N remobilization more efficient. The estimated amount of N lost by fallen leaves increased with the N dose and reached approximately 40 kg N ha⁻¹ at the highest rate of N fertilization. Under similar level of N fertilization, this amount is higher than the 20 kg N ha⁻¹ reported by Schjoerring *et al.* (1995) but closed to the 45 kg N ha⁻¹ reported by Malagoli *et al.*, (2005). These results indicate that the amounts of N lost by leaf fall are significant and suggest that leaf N remobilization could be improved to sustain grain filling and limit N losses.

D.4 Agronomic overview

N200 plants displayed the highest real N Remobilization Efficiency (NRE) as well as N Translocation Efficiency (NTE, Figure II.6B). Thus, N200 plants appeared to be the most efficient to remobilize N from vegetative tissues and to allocate the N taken up after flowering to pods. However, the N Harvest Index (NHI) and the N Utilization Efficiency (NUtE) of these plants were low and increased irrespective of N dose (Figure II.6C). Including the N amount lost

by fallen leaves, the NHI declined of about 10% whatever the N treatment. These results are in accordance with the values usually observed in oilseed rape (Schjoerring *et al.*, 1995; Barlog and Grzebisz, 2004; Malagoli *et al.*, 2005) and confirm the source-sink unbalance during the reproductive growth. Those indexes are helpful tools to screen genotypes on their ability to manage N uptake and N remobilization. Studies have been held on contrasted genotypes to select the serious possible ways to counterbalance the source limitation during grain filling (see companion paper).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Conseil Régional de Basse-Normandie and the Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM) for Julie Gombert's PhD grant. We are grateful to the technical staff of Caen (A Bré, M Coustenoble, MP Bataillé, P Beauclair, D Ballois and F Meuriot) and Grignon (E Fovart, J Rodrigues and F Lafouge) for their massive help during the whole experiment. This work was supported by a grant from PROMOSOL.

Chapitre III

Chapitre III. Nitrogen Dynamics in Field Grown Winter Oilseed Rape. II. Genotypic differences in interaction with N supply.

Running title: Genotypic differences in N dynamics in oilseed rape

Julie GOMBERT¹, Frédéric LE DILY^{1*}, Philippe ETIENNE¹, Jean-Michel ALLIRAND², Alexandra JULLIEN², Xavier PINOCHET³ et Alain OURRY¹

1 – UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S, Université de Caen Basse Normandie, 14032 Caen cedex, France.

2 – UMR INRA-INA PG Environnement et Grandes Cultures, 78850 Thiverval Grignon, France.

3 – CETIOM (Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains), centre de Grignon, 78850 Thiverval-Grignon, France.

* – Corresponding author, e-mail: frederik.ledily@unicaen.fr

Soumis à Annals of Botany

KEY WORDS: *Brassica napus* L., cultivars, genotypic difference, nitrogen, N uptake, N remobilization, N partitioning, ¹⁵N labelling, winter oilseed rape.

RESUME :

➤ **Contexte et objectifs** Le colza d'hiver se caractérise par une faible efficacité d'utilisation de l'azote en raison d'une remobilisation relativement faible de l'azote des organes végétatifs (en particulier les feuilles) vers les organes en croissance. En conséquence, cette culture requiert de forts niveaux de fertilisation azotée et les feuilles chutent avec une teneur élevée en azote résiduel. Une meilleure efficacité de l'azote chez le colza pourrait réduire le niveau de fertilisation azotée et améliorer l'impact environnemental de la culture, sans affecter le rendement grainier. Une compréhension plus approfondie des dynamiques de l'azote au sein de la plante apparaît donc comme indispensable. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet du génotype en interaction avec la fertilisation azotée, sur les dynamiques d'absorption, de répartition et de remobilisation de l'azote.

➤ **Méthodes** L'expérimentation a été conduite sur trois cultivars de colza d'hiver (*Brassica napus* L. cv. Capitol, Pollen, Saturnin) cultivés au champ sous deux niveaux de fertilisation azotée (100 et 200 kg N ha⁻¹). Les plantes ont été récoltées fréquemment depuis la reprise de végétation (Stade de Développement SD 2,4) jusqu'à la maturité (SD 9,9) en utilisant une technique de marquage ¹⁵N de manière à distinguer dans chaque tissu l'azote issu de l'absorption de celui provenant de la remobilisation.

➤ **Résultats clés** La répartition de l'azote absorbé et l'absorption post-floraison de l'azote sont affectées par le génotype. Cependant, une réduction de l'absorption de l'azote lors de la floraison est observée quels que soient le génotype et le traitement azoté appliqué. En fonction du génotype et du traitement azoté, 63-89% de l'azote contenu dans les siliques est issu de la remobilisation de l'azote depuis les organes végétatifs, les feuilles étant la principale source d'azote remobilisé. La contribution relative de chaque organe végétatif à la remobilisation de l'azote est similaire quels que soient le génotype et le traitement azoté. Par contre, l'efficacité de remobilisation de l'azote des feuilles est affectée par le génotype et le traitement azoté.

➤ **Conclusion** Prolonger dans le temps la valeur du LAI permettrait de subvenir à une limitation de l'azote par les sources lors du développement des siliques et améliorer, par la même occasion, la remobilisation de l'azote des feuilles.

ABSTRACT

➤ **Background and Aims** Winter oilseed rape is characterized by a low nitrogen (N) utilization efficiency due to a relatively low N remobilization from vegetative (mostly leaves) to growing parts of the plant. Thus, this crop requires high rate of N fertilization and leaves fall with high N content. Improving the efficiency of rape would reduce the rate of N fertilization and enhance its environmental impact of without decreasing yield. Consequently, it is crucial to better understand the dynamics of N through the plant. The present investigation was therefore realized to study the effect of genotypes in interaction with N fertilization on the dynamics of N uptake, partitioning and remobilization under field conditions.

➤ **Methods** The field experiment was conducted with three cultivars of winter oilseed crop (*Brassica napus* L. cv. Capitol, Pollen and Saturnin) under two levels of N dose (100 and 200 kg N ha⁻¹). Plants were sampled frequently from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) by using a ¹⁵N labelling technique in order to distinguish in each tissue N coming from uptake or remobilization.

➤ **Key Results** Genotypes affected the partitioning of N taken up and post-flowering N uptake. However, N uptake always declined during flowering. According to genotype and N treatment, 63-89% of pods N came from N remobilization of vegetative tissues, green leaves being the main source of remobilized N. The relative contribution of each vegetative organ to N remobilization was similar among genotypes and N doses. By contrast, the efficiency of N remobilization in leaves was affected by genotype and N treatment.

➤ **Conclusion** Improving the duration of LAI could counterbalance the N source limitation during pod development and also improve leaf N remobilization.

KEY WORDS: *Brassica napus* L., cultivars, genotypic difference, nitrogen, N uptake, N remobilization, N partitioning, ¹⁵N labelling, winter oilseed rape.

A Introduction

Winter oilseed rape is the dominant oilseed crop in Western Europe and is grown as an oil crop for both edible and industrial uses. In the last decades, great varietal improvements have been made on oilseed rape to improve yield and disease tolerance and also to reduce the level of erucic acid in oil and the content of glucosinolates in rapeseed meal (Walker and Booth, 2001).

Despite its high capacity for uptake of soil mineral nitrogen (Lainé *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1997), the nitrogen harvest index (NHI, proportion of N in grain in relation to total above-ground N at maturity) of oilseed rape is low (0.5-0.7) as compared with cereals (Spiertz and De Vos, 1983; Dreccer *et al.*, 2000). As a consequence, oilseed rape requires high rate of N fertilization to maximise yield (Hocking *et al.*, 1997; Holmes, 1980; Kirkegaard *et al.*, 1997). Since N is the main input in winter oilseed rape in high input agricultural systems, high rates of N fertilizer combined to an inefficient use of applied N leads to risks of N pollution through leaching and denitrification (Gammelvind *et al.*, 1996) and also to high input costs.

To address both economic and environmental issues, the use of N fertilizer needs to be reduced. The challenge of maintaining yield using the minimum possible level of N fertilization could be met with the improvement of crop N management and the breeding of N efficient genotypes. By contrast to N fertilization, only a few publications have dealt with the effect of genotype on the N use efficiency, although Grami and Lacroix (1977) demonstrated the inheritance of N uptake and distribution in oilseed rape. The N use efficiency (NUE) of a given genotype will depend primarily on its capacity to take up N from the soil (N uptake efficiency) and then on its ability to use it (N Utilization Efficiency, NUtE, seed yield per unit of N taken up by the plant) to the development of the seeds (Sattelmacher *et al.*, 1994). The crop accumulates approximately 6 kg of N to produce 100 kg of seeds, which equals to a NUtE of about 16.6 kg seed kg⁻¹ above-ground plant N (Rathke *et al.*, 2006). This NUtE of oilseed rape is therefore very low compared to the value of Moll *et al.* (1982) observed in maize (32-59 kg kg⁻¹) and in barley (39-58 kg kg⁻¹, Delogu *et al.*, 1998). According to Yau and Thurling (1987), the genetic variation in nutrient uptake and efficiency in oilseed rape is more important under suboptimal nutrient supply. However, a recent study underlines the lack of interaction between cultivars and N treatments for dry matter production as well as for the NUE (Svecnjak and Rengel, 2006). The identification of the factors responsible of the low NUE in oilseed rape appears to be a necessary prerequisite for breeding.

As mentioned by Diepenbrock (2000), physiological processes play a key role in variations in yield as well as in selection of high yielding material. Thus, improving the efficiency of N use requires a better understanding of the N dynamics within the plant. Although numerous studies on oilseed rape have been reported in the literature, physiological mechanisms explaining the efficiency of N dynamics remain unclear. Recent studies using ^{15}N labelling demonstrated the complexity of N flows within the plant during the growth cycle of oilseed rape (Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005). Thus, the taproot and stems may act as a buffering storage compartment of N between leaf N remobilization and N pod filling (Rossato *et al.*, 2001). The accurate description of N flows from or to each individual leaf rank by Malagoli *et al.* (2005) showed a different pattern of N recycling from leaves to vegetative or reproductive organs, according to their position in the canopy. However, these studies did not take into account the effect of genotype or N fertilization. The present investigation was therefore conducted to study the effect of genotype on the dynamics of N uptake, partitioning and remobilization in a field-grown winter oilseed rape under two levels of N dose (100 and 200 kg N ha⁻¹). Plants were sampled frequently from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) by using a ^{15}N labelling technique in order to distinguish in each tissue, N derived from uptake or remobilization. Plants of each genotype and N treatment were also compared on the characteristics of their fallen leaves. Fallen leaves were collected very carefully in order to evaluate the residual N according to the leaf rank. Amounts of lost N from stem extension to maturity were also calculated.

The present paper investigates the impact of genotype in interaction with different levels of N fertilization on the N dynamics while a companion paper focuses on the effect of N fertilization.

B Materials and methods

B.1 Experimental site and cultivars

The field experiment was conducted in Grignon (Paris Basin, France) in the growing season of 2004. The preceding crop was winter barley. Three cultivars of winter oilseed crop (*Brassica napus* L. cv. Capitol, Pollen and Saturnin) were sown on a loamy soil on the 27th of August, at the density of 71 plants per m² and with a row spacing of 17.5 cm. Potassium and phosphorus were applied in an amount of 100 kg ha⁻¹ on the 3rd of September. Sulphur was applied in an amount of 75 kg ha⁻¹ on the 24th of February.

Cultivars were chosen according to their differences on height and timing of flowering. The genotype Capitol is studied as a reference in the laboratory from several years, it displays half early flowering and a normal height. The genotype Pollen presents half late flowering and normal height whereas Saturnin is a semi-dwarf hybrid with half early flowering.

B.2 Experimental treatments, labelling and sampling

Two treatments were defined according to the level of N application: N100 and N200 receiving 100 and 200 kg N ha⁻¹, respectively. N fertilizer was applied as NH₄NO₃. The N200 treatment was splitted as 100 kg N ha⁻¹ on the 15th of September 2003 while both N100 and N200 treatments were given 40 kg N ha⁻¹ on the 24th of February and 62 kg N ha⁻¹ on the 16th of March.

The ¹⁵N labelling experiment was performed from stem extension (GS 2,4) to seed maturity (GS 9,9) according to the methodology used by Malagoli *et al.* (2005). One week before each harvest date, six plants of each treatment and at the same developmental stage were selected inside the canopy. Then, 750 ml of labelled N (1 mM K¹⁵NO₃, ¹⁵N excess = 10%) was carefully applied around each plant, at the soil surface (about 400 cm²). Seven days after ¹⁵N labelling, plants were harvested. The petiole of each senescing leaf was attached to the stem by a nylon thread in order to collect the fallen leaves later on, according to their position on the axis of the plant.

Due to time consuming harvests, one genotype was harvested each week and so, plants of each genotype were harvested every third week. At each sampling, plants were separated into the following six fractions: taproot, green and fallen leaves, stems, flowers and pods. Because flowers and lateral roots constitute organs difficult to quantitatively study in field conditions, roots were omitted for further analysis and flowers were only taken into account for total plant N amount. Immediately after the fractionation, fresh weight (FW) and total surface area of leaves were measured and dry matter (DM) was determined after drying at 80°C for 48 h.

In field conditions, the choice of individual plant in the canopy is extremely difficult. During the stem extension, the choice of the plants was made with the help of two mean criteria: the plant's size and the taproot diameter. However, these criteria appeared to be not sufficient after flowering and the chosen plants were larger than the mean plant obtained at the meter square scale. This is why the experimental data of dry weight in each tissue were corrected to obtain values of an average plant by using a correction ration calculated as the mean of the four following ones:

$$\frac{\text{Mean plant dry weight}}{\text{Individual plant dry weight}} \qquad \frac{\text{Mean plant leaf area index}}{\text{Individual plant leaf area index}}$$

Mean plant taproot diameter

Mean plant seed dry weight

Individual plant taproot diameter

Individual plant seed dry weight

This index was calculated for each genotype, at each harvest date and for each level of N fertilization.

Time was expressed in cumulative degree days after sowing ($^{\circ}\text{C DAS}$), using 4°C as the base temperature and the stages in development were determined according to the growth stage identification key of oilseed rape by Sylvester-Bradley and Makepeace (1984).

B.3 Chemical analysis and calculation of N fluxes

The plant material was ground to a fine powder for isotopic analysis. The total N and ^{15}N in the plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy).

Total N amount of a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

$$N \text{ tot}_{i,t} = \%N_{i,t} \times DM_{i,t}$$

N uptake was estimated by the difference of the plant N amount between two harvest times, *ie* three weeks. Excess ^{15}N in each tissue combined with total plant N uptake obtained previously, allowed calculating the partitioning of N taken up. Based on the following assumptions, i) unlabelled N from the soil was taken up and allocated in different plant tissues similarly to labelled N, ii) N uptake and allocation observed in one week was similar during the two weeks before, then N uptake by each tissue was calculated as:

$$N \text{ uptake}_{i,t} = \frac{(N \text{ tot}_t - N \text{ tot}_{t-3 \text{ weeks}}) \times {}^{15}\text{N excess in i tissue}}{\text{total } {}^{15}\text{N excess in plant}}$$

With $N \text{ tot}_t$: total N in plant at time “t” (i.e. one week after the application of ^{15}N fertilizer).

$N \text{ tot}_{t-3 \text{ weeks}}$: total N in plant three weeks before

At each harvest, the amount of N mobilized from or to each tissue was calculated by subtracting the total N amount (N_t) from the N derived from uptake and the previous N amount found in this tissue three weeks before, according to the following equation:

$$N \text{ mob}_{i,t} = N_{i,t} - N_{i,t-3 \text{ weeks}} - N \text{ uptake}_{i,t}$$

Therefore, positive values of N mobilized represent N that is mobilized to this tissue, while negative values correspond to a net mobilization of N from this tissue.

B.4 Indexes of N use efficiency

Apparent N remobilization efficiency (NRE) was calculated without the use of ^{15}N data, according to the following equation:

$$\text{Apparent NRE (\%)} = \frac{\text{N veg flowering} - \text{N veg maturity}}{\text{N veg flowering}} \times 100$$

With N veg flowering the N amount in the vegetative plant parts at flowering (A, Figure III.6A) and N veg maturity the N amount in the vegetative plant parts at maturity (B, Figure III.6A). (Apparent NRE is equal to $([A-B]/A) \times 100$, see Figure III.6A).

Real N remobilization efficiency corresponds to the amount of N in pods coming from N remobilization of vegetative tissues estimated by ^{15}N labelling and was calculated as:

$$\text{Real NRE (\%)} = \frac{\text{Pod N derived from N remobilization}}{\text{Pool of remobilized N}} \times 100$$

N translocation efficiency (NTE) was calculated as:

$$\text{NTE (\%)} = \frac{\text{Pod N derived from N uptake}}{\text{Total N taken up after flowering}} \times 100$$

N Harvest Index (NHI) was calculated according to the following equation:

$$\text{NHI (\%)} = \frac{\text{Seed N at maturity}}{\text{Shoot N at maturity}} \times 100$$

NHI was also calculated with the N in fallen leaves incorporated to the shoot N (NHI +FL).

N utilization efficiency (NUtE) for yield production was calculated as:

$$\text{NUtE} = \frac{\text{Seed dry weight at maturity}}{\text{Shoot N at maturity}} \quad (\text{kg kg}^{-1} \text{ N})$$

B.5 Statistical analysis

All experiments were performed with 6 individual plants. The resulting variation in the measurements was expressed as the mean \pm SD for $n=6$. Statistical analyses were performed using Minitab. After having checked the normality of the data (Anderson-Darling test, 95%) and the equality of the variances (Bartlett test, 95%), treatment and genotype effects were tested by

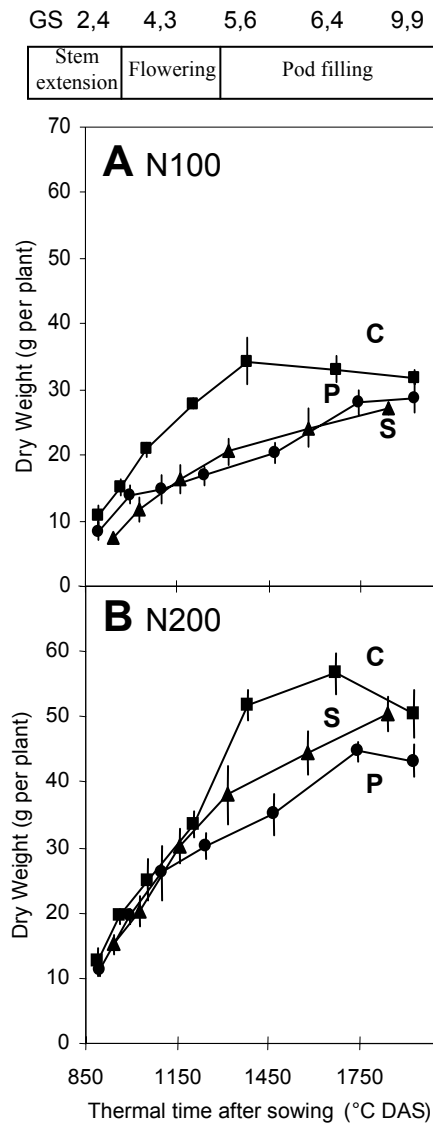


Figure III.1: Thermal time course of total biomass accumulation in three field-grown *Brassica napus* genotypes ‘Capitol’ (●), ‘Pollen’ (■) and ‘Saturnin’ (▲), from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9). Plots received 100 kg N ha⁻¹ (A) or 200 kg N ha⁻¹ (B). Note the different scale. Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

ANOVA (GLM) and the significance of differences was estimated using the Tuckey test (95%). When data did not realize the parametric test conditions, the non parametric test of Kruskal Wallis was applied followed by Tukey or Mood median test (95%) to compare means or medians.

C Results

The experiment was conducted under field conditions starting at stem extension (GS 2,4) at 897°C days after sowing (DAS) and ending at maturity (GS 9,9) at 1927°C DAS. Three genotypes (Capitol, Pollen and Saturnin) and two levels of N fertilization (100 and 200 kg N ha⁻¹ called N100 and N200, respectively) were studied.

C.1 Dry matter production

Dry matter production was significantly increased by N supply (Figure III.1). Except for the genotype Saturnin that showed a similar response to a high N fertilization (the dry weight production was increased by about 46% throughout the experiment), both genotypes Capitol and Pollen presented an increase of biomass production to N fertilization of about 14% and 25% at the beginning of the experiment to 37% and 33% at maturity, respectively (Figures III.1A and 1B). Genotypes significantly differed in total plant biomass. The biomass of the genotype Capitol was higher than both other genotypes whatever the N treatment (Figures III.1A and 1B). Capitol is the tallest genotype and the higher biomass was mainly explained by the rapid growth of the stems. The stem biomass of the genotype Capitol approximately represented the double than the stem biomass of the genotypes Pollen and Saturnin (data not shown).

While a genotypic variation in total plant biomass was found, seeds dry weight at maturity was similar between genotype at a given N fertilization and reached an average of 7.8 and 11.6 g plant⁻¹ for the N100 and N200 treatments, respectively (data not shown for seeds).

C.2 N accumulation and mobilization

The pattern of total N accumulation in whole plant varied with the N supply and the genotype (Figure III.2). The final amount of N was approximately doubled with the N supply (approximately 350 and 650 mg N plant⁻¹ for N100 and N200 plants, respectively). Whereas it did not differ among genotypes for each N treatment, the pattern of N accumulation depended on the genotype. In N100 plants (Figure III.2), both genotypes Pollen and Saturnin displayed post-flowering N accumulation. Under N200 conditions, post-flowering N uptake was observed with

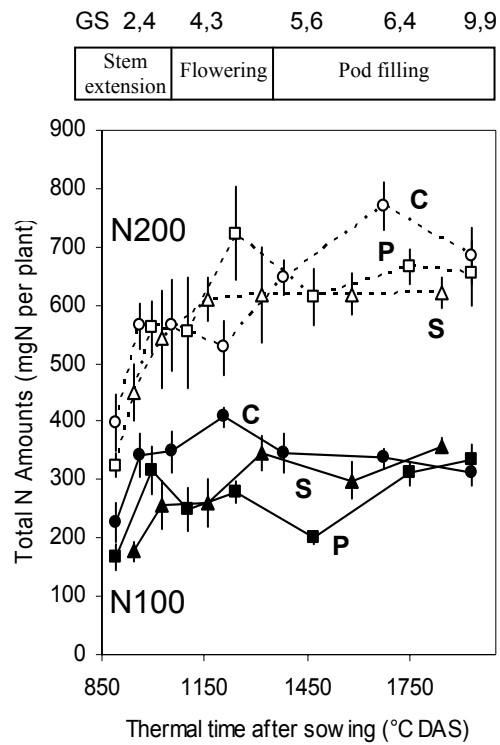


Figure III.2: Thermal time course of N uptake (estimated from N content in plant and taking into account fallen leaves) in three field-grown *Brassica napus* genotypes ‘Capitol’ (●), ‘Pollen’ (■) and ‘Saturnin’ (▲), from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9). 100 kg N ha⁻¹ (filled symbols) and 200 kg N ha⁻¹ (open symbols). Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

the genotypes Capitol and Pollen. On the opposite, no N uptake was observed during pod filling in the genotypes Capitol and Saturnin under N100 and N200 conditions, respectively. However, whatever the N treatment and the genotype, N accumulation was highly reduced during flowering.

The time course of N accumulation and mobilization from the different organs highly responds to N fertilization and to a lesser extent to genotype (Figures III.3 and 4). Whatever the N treatment and the genotype, the green leaves were the larger sink organs for N during stem extension and then, the N amount rapidly decreased from flowering (Figures III.3A and 4A). The concomitant slight increase of the N amount in the fallen leaves underlined that the major part of green leaves N had been mobilized to the growing organs. The amount of N in fallen leaves of the genotype Pollen was lower than both other genotypes under N100 conditions (Figure III.3A), whereas no genotypic variation was observed under N200 conditions (Figure III.4A). At maturity, the N contained in the fallen leaves of N100 plants corresponded to approximately 16% and 26-33% of the maximal green leaves N amount for the genotype Pollen and both other genotypes, respectively, whereas it represented approximately 31-40% for N200 plants (Figure III.4A), whatever the genotype.

Stems became the major N sink organs during flowering. N accumulation reached a maximum value during flowering and N remobilization occurred during pod filling (Figures III.3B and 4B). The rate of N accumulation in stems depended on the N fertilization and also on the genotype. Under N100 conditions, N accumulation exceeded 140 mg N plant⁻¹ for the genotype Capitol while it did not reach 100 mg N plant⁻¹ for the others genotypes (Figure III.3B). However, at maturity the stems N amount was similar among the genotypes. These genotypic variations were not observed under N200 conditions (Figure III.4B).

From the beginning of their development, the pods displayed a rapid and high N accumulation, as they constituted the most active sink for N (Figures III.3C and 4C). The response to N supply was highly significant (increase over 35% between both rate of N fertilization) and genotypes displayed different patterns of N accumulation in pods according to the N treatment. At harvest, seeds N amounts under N100 conditions was lower for the genotype Capitol (179 mg N plant⁻¹) than both others genotypes (approximately 234 mg N plant⁻¹) whereas it reached about 378 mg N plant⁻¹ in N200 plants independently to the genotype (data not shown for seed). As the total plant N amount did not differ among genotypes of each N treatment (see above, Figure III.2), N contained in seeds at maturity corresponded to about 57-76% of the final N amount of the plant according to the N treatment and the genotype.

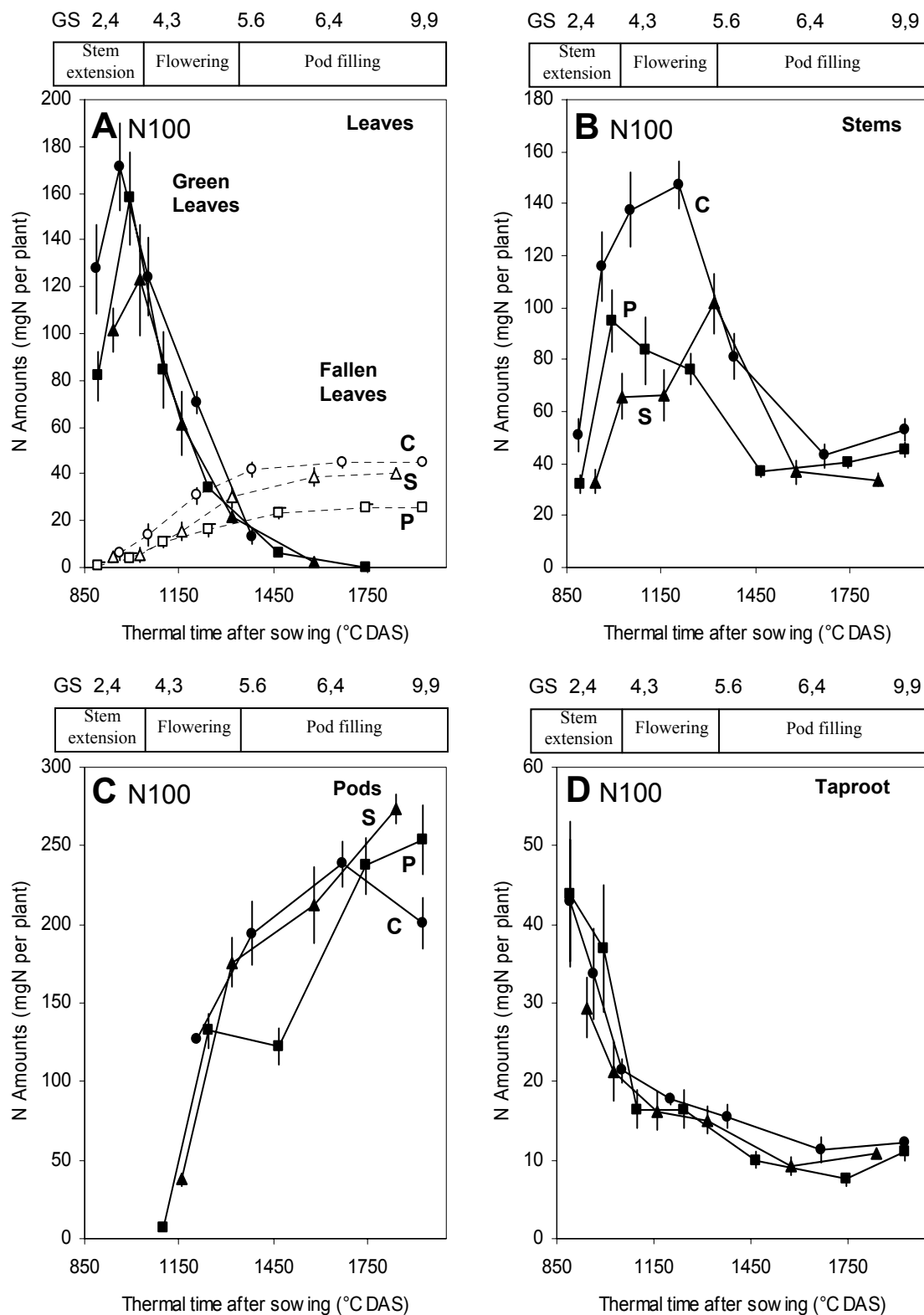


Figure III.3: Thermal time course of total N amount in three field-grown *Brassica napus* genotypes 'Capitol' (●), 'Pollen' (■) and 'Saturnin' (▲), separated into leaves (A), stems (B), pods (C) and taproot (D), from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9). Leaf N amount (A) was separated into green leaves (filled symbol) and fallen leaves (open symbols). Plot received 100 kg N ha⁻¹. Note the different scale. Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

Whatever the N treatment and the genotype, the taproot N amount greatly decreased during stem extension and flowering, remaining thereafter relatively constant (Figures III.3D and 4D). While similar N patterns were observed in N100 plants, the initial value of N amount in taproot differed among genotypes under N200 conditions. At the beginning of the experiment, the genotype Saturnin displayed a taproot N amount of 59.3 mg N plant⁻¹ while Capitol plants amount was 24.6 mg N plant⁻¹. However, at maturity the final N amount was similar among genotypes.

C.3 Loss of nitrogen by leaf fall

For each genotype and N treatment, green leaves were individually attached to the stem, allowing fallen leaves to be accurately sampled at each harvest (i.e. every third weeks) according to their leaf rank on the terminal as well as on the axillary's racemes. Thus, the dry matter and N content patterns in fallen leaves was monitored under field conditions from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9).

The cumulative dry weight of fallen leaves was obtained by adding the dry weight of every fallen leaves harvested during the experiment (Figure III.5A). N dose and genotype affected the cumulative dry weight of the fallen leaves but no genotype x N treatment interaction was observed. The genotype Pollen displayed the lowest cumulative dry weight of fallen leaves under low and high N supply. Whatever the genotype, increased N fertilization approximately doubled the cumulative dry weight. Although the observed variations due to N supply and genotype, two third of the final cumulative dry weight was reached during flowering, around 1200°C DAS, irrespective of the N dose and genotype.

The residual N content of the fallen leaves was also markedly affected by the N treatment and genotype (Figures III.5B and 5C). N fertilization significantly increased the N content of the fallen leaves from approximately 1,1% to 1,5% under N100 and N200 conditions, respectively. Under N100 conditions (Figure III.5B), the genotype Saturnin displayed a higher N content in fallen leaves than both other genotypes. This was particularly observed in uppermost leaves (from leaf rank 16), underlying a lower leaf N remobilization. Under N200 conditions (Figure III.5C), the better N remobilization was observed in the leaves of the genotype Capitol that displayed the lowest N content. However, the genotype x N treatment interaction was not significant. Whereas the N content was lower in the uppermost leaves for the genotypes Capitol and Pollen, it trended to be higher than in the basal leaves for the genotype Saturnin, whatever the N supply.

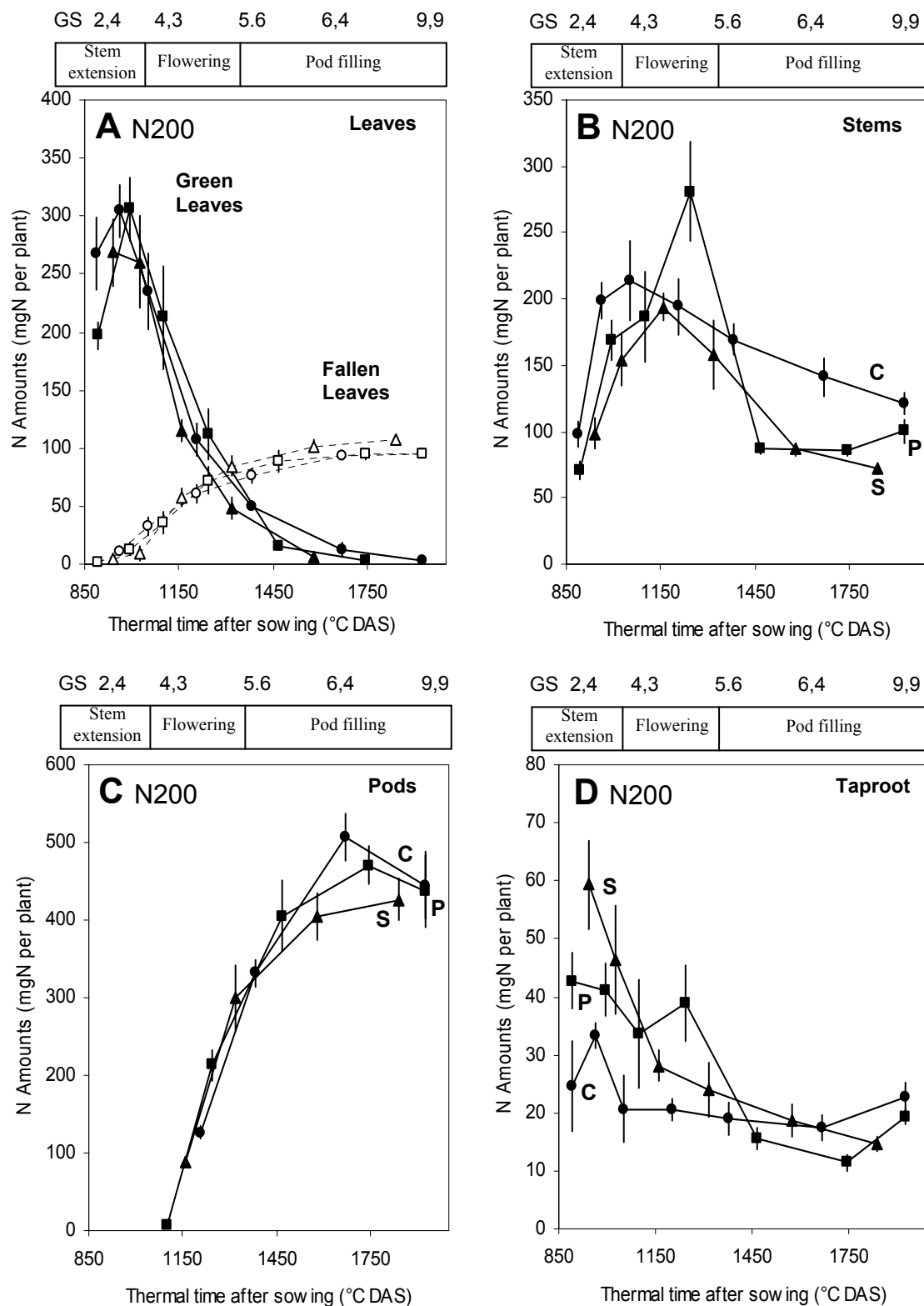


Figure III.4: Thermal time course of total N amount in three field-grown *Brassica napus* genotypes 'Capitol' (●), 'Pollen' (■) and 'Saturnin' (▲), separated into leaves (A), stems (B), pods (C) and taproot (D), from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9). Leaves N amount (A) was separated into green leaves (filled symbol) and fallen leaves (open symbols). Plot received 200 kg N ha⁻¹. Note the different scale. Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

During the studied period, the cumulated amounts of N lost in fallen leaves reached 26.8, 15.9 and 26.5 kg N ha⁻¹ respectively for the genotypes Capitol, Pollen and Saturnin in plots receiving 100 kg N ha⁻¹ and 41, 41.1 and 52.5 kg N ha⁻¹ respectively in plots receiving 200 kg N ha⁻¹ (data not shown).

C.4 N Dynamics

The flows charts (Figure III.6) represent the partitioning of N (taken up and remobilized) through the major organs of the plant (pods, leaves, stems and taproot) from stem extension to maturity. By ¹⁵N labelling, it was possible to follow and to quantify the partitioning of the N taken up during the plant development.

Exogenous N supply

The amount of N taken up varied with the N treatment and the genotype and the significant genotype x N treatment interaction indicated that genotypes behave differently under each N treatment. Under N100 conditions (Figure III.6A), the genotype Pollen displayed a higher amount of N taken up than the genotypes Saturnin and Capitol (306.6, 209.6 and 151.5 mg N plant⁻¹, respectively). The N supply increased the amount of N taken up (Figures III.6A and 6B), except for the genotype Saturnin that displayed the lowest amount of both N treatments (112.5 mg N plant⁻¹). According to the organ, the partitioning of the exogenous N also varied with the N dose and the genotype (Table III.1). However, the N allocation to the stems represented approximately 35% of the N taken up irrespectively of N treatment and genotype and the N allocation to the taproot was the lowest of the studied organs (between 4.4% and 12%). Differences in N partitioning were observed for the pods and leaves with relative proportions from 4.2% to 37.9% and from 16.1% to 57.1%, respectively. Under N100 conditions, the genotype Capitol displayed a different partitioning than others genotypes whereas under N200 conditions, this was observed with the genotype Saturnin. Both displayed a low N allocation to the pods due to their time course of N uptake (see above, Figure III.2). Their N uptake mostly occurred during stem extension.

Remobilization of endogenous N from vegetative organs

The amount of total N remobilized from vegetative organs varied with the N treatment and the genotype and the genotype x N treatment interaction was significant (Figures III.6A and 6B). The amount of total N remobilized increased approximately of 40% with the N supply. Under N100 conditions, the genotype Saturnin displayed a lower pool of remobilized N (226.7 mg N plant⁻¹) whereas the genotype Pollen showed a higher pool under N200 conditions (482 mg N plant⁻¹) than others genotypes. By contrast, the relative contribution of leaves, stems and

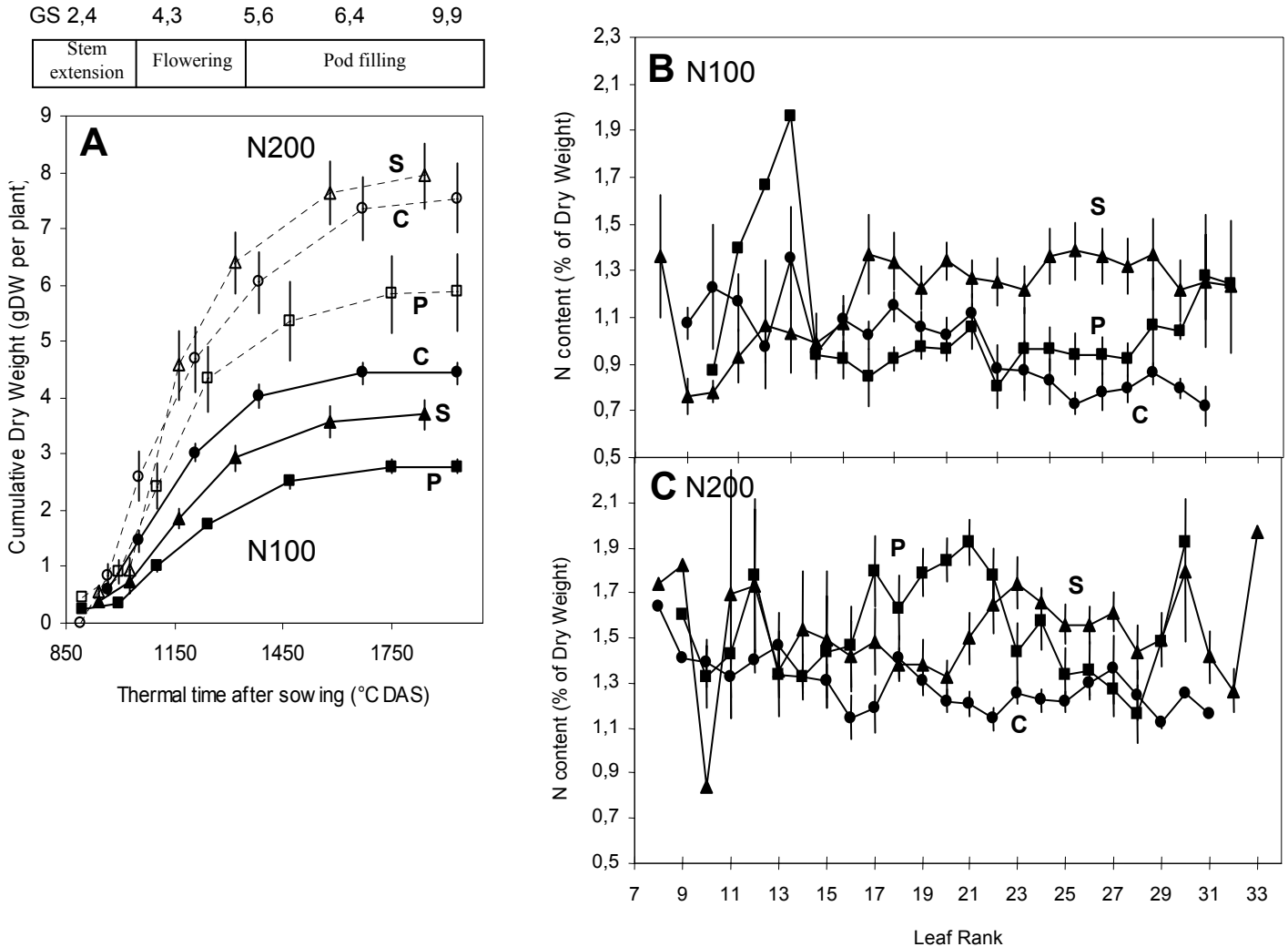


Figure III.5: Cumulative biomass of fallen leaves (A) in three field-grown *Brassica napus* genotypes ‘Capitol’ (●), ‘Pollen’ (■) and ‘Saturnin’ (▲), from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) under two levels of N fertilization: 100 kg N ha⁻¹ (filled symbols) and 200 kg N ha⁻¹ (open symbols). Total N content pattern of fallen leaves under N100 conditions (B) and N200 conditions (C). Data are means and vertical bars indicate ± standard deviation for n=6 when larger than the symbol.

taproot was not affected by the N treatment and the genotype. Leaves were the main source of remobilized N providing approximately half of the pool of remobilized N (Table III.1). Stems and taproot contributed respectively to around 36% and 15% of the pool of remobilized N. Pods represented the main sink organs for remobilized N, receiving more than 56.8% (Pollen N100, table III.1) of total remobilized N.

Contribution of exogenous and remobilized N to the final N amount of pods

The final N amount in pods (sums of columns “pod exogenous N” and “pod remobilized N”, Figure III.6; “N taken up” and “remobilized N”, table III.1) increased by 42-55% with the N supply but was not affected by the genotype. While the amount of pod N coming directly from N uptake highly varied with the N supply and the genotype, the amount of N coming from N remobilization was quite similar among genotypes of each N treatment (Table III.1). Whatever the N treatment and the genotype, the major part of N in pods at maturity (63-89%, calculated from table III.1) came from N remobilization. Due to the absence of post-flowering N uptake for the genotypes Capitol and Saturnin, respectively under N100 and N200 conditions (Figure III.2), the extremely low relative contribution of exogenous N was compensated by a high N remobilization from vegetative organs to pods (over 80% of the pod N came from N remobilization).

C.5 N indexes

The apparent N remobilization efficiency (NRE) informs on the amount of N remobilized from vegetative organs (including fallen leaves) between flowering (Figure III.7A, arrow A) and maturity (Figure III.7A, arrow B). The apparent NRE was higher in N100 plants than in N200 ones (Figure III.7B). The genotype Pollen displayed a higher apparent NRE (74.9%) than others genotypes under N100 conditions whereas under N200 conditions, the lowest value (57.1%) was observed with the genotype Capitol.

The real NRE is calculated from ^{15}N labelling, which allows to precisely distinguish endogenous and exogenous N of each organ and corresponds to the percentage of N in pods coming from N remobilization related to the pool of total remobilized N. Thus, the real NRE takes into account the whole N remobilization from vegetative tissues (leaves, stems and taproot). Surprisingly, the real NRE increased with the N supply whatever the genotype (Figure III.7B). Thus, the proportion of remobilized N allocated to pods was higher with increasing rate of N fertilization. The genotype Saturnin displayed particularly high values of real NRE, even superior to 100%, which is theoretically impossible. This means that the amount of N remobilized in pods was higher than the available pool of total N that can be remobilized from

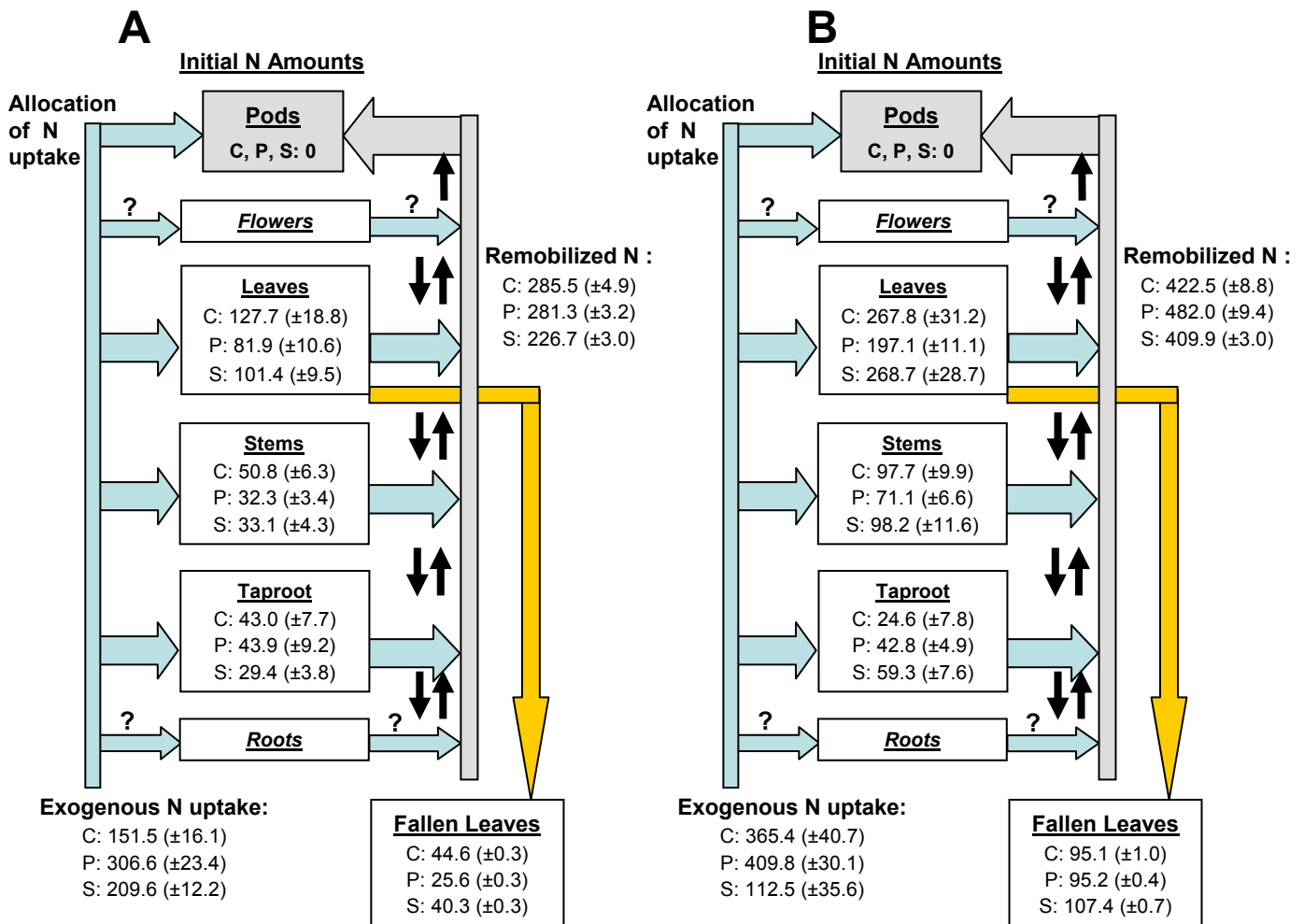


Figure III.6: Overview of N dynamics in three field-grown *Brassica napus* genotypes ‘Capitol’ (C), ‘Pollen’ (P) and ‘Saturnin’ (S) from stem extension (GS 2,4) to maturity (GS 9,9) under two levels of N fertilization: 100 kg N ha⁻¹ (A) and 200 kg N ha⁻¹ (B). N amounts are expressed in mg N plant⁻¹ and each value is given as the mean \pm standard deviation for n=6.

vegetative organs. This observation probably underlined the lack in the calculations of organs like flowers or roots, for which a role in N remobilization to pods can be suggested.

The N translocation efficiency (NTE) represents the part (%) of N taken up directly allocated to the pods (Figure III.6B) and was a parameter showing little variability (the standard deviation was usually lower than 4% of the mean). The NTE highly varied with the N supply and the genotype. The highest and lowest NTE were observed under N200 conditions in plants of the genotype Capitol (65.6%) and Saturnin (20.0%), respectively. This low NTE was linked to the pattern of N uptake (see above, Figure III.2).

The N Harvest Index (NHI) represents the amount of N in seeds expressed as a percentage of the N amount in above-ground biomass at maturity. The NHI trended to decline with the N supply (Figure III.7C). Whatever the N treatment, the genotype Saturnin displayed higher values of NHI than other genotypes. When the N amount lost by fallen leaves was taken into account (NHI +FL), the NHI decreased of about 10% except for the genotype Pollen under N100 conditions that displayed a decrease of only 6% due to the lower amount of N lost by fallen leaves (Figures III.3A and 4A, III.6).

The N Utilization Efficiency (NUE) represents the seed dry matter production per above-ground plant N at maturity. The NUE declined with increased N fertilization from 26.6-27.7% under N100 conditions to 20.1-23.4% under N200 conditions (Figure III.7C). Differences in NUE among genotypes were not significant whatever the N treatment.

D Discussion

The aim of the present work was to study the effect of genotypes on the dynamics of N uptake, partitioning and remobilization in three field-grown winter oilseed rape genotypes (Capitol, Pollen and Saturnin) under two levels of N dose (100 and 200 kg N ha⁻¹).

D.1 N Uptake

Despite significant differences in the amount of N taken up during the studied period (Figure III.6), the plant N amount at maturity was similar among genotypes of each N treatment (Figure III.2). Whatever the N dose and the genotype, N uptake slowed down during flowering (Figure III.2). This reduction of N uptake during flowering has been repeatedly reported (Merrien *et al.*, 1988; Schjoerring *et al.*, 1995; Gabrielle *et al.*, 1998; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2005) and could be explained by a punctual unbalance between N sources and

Table III.1: Total amounts of N taken up and remobilized and their relative proportion in pods, leaves, stems and taproot from stem extension (GS 2.4) to maturity (GS 9.9) in three field-grown *Brassica napus* genotypes ‘Capitol’ (C), ‘Pollen’ (P) and ‘Saturnin’ (S), under two levels of N fertilization: 100 and 200 kg N ha⁻¹. A positive N remobilization (+) represents N coming into an organ while a negative one (-) represents N coming out of an organ. N amounts are expressed in mg N plant⁻¹ and each value is given as the mean of six individual plants.

Genotype X N fertilization	Tissues	Allocation of N taken up	% of total N taken up	Remobilized N	% of total remobilized N
C100	Pods	22.3	14.7	178.5	62.5
P100	Pods	94.2	30.7	159.7	56.8
S100	Pods	62.8	30.0	210.8	93.0
C200	Pods	138.5	37.9	306.5	72.5
P200	Pods	88.1	21.5	349.7	72.6
S200	Pods	4.7	4.2	421.7	102.9
C100	Leaves	53.4	35.2	-136.5	-47.8
P100	Leaves	71.9	23.5	-129.1	-45.9
S100	Leaves	33.7	16.1	-97.3	-42.9
C200	Leaves	69.9	19.1	-242.0	-57.3
P200	Leaves	124.1	30.3	-226.9	-47.1
S200	Leaves	64.2	57.1	-230.9	-59.6
C100	Stems	58.7	38.7	-109.5	-38.3
P100	Stems	99.9	32.6	-97.3	-34.6
S100	Stems	67.0	32.0	-85.6	-37.8
C200	Stems	130.8	35.8	-149.2	-35.3
P200	Stems	146.9	35.8	-193.1	-40.1
S200	Stems	41.7	37.1	-121.9	-31.5
C100	Taproot	7.8	5.1	-39.5	-13.8
P100	Taproot	22.0	7.2	-54.9	-19.5
S100	Taproot	25.1	12.0	-43.8	-19.3
C200	Taproot	19.1	5.2	-31.3	-7.4
P200	Taproot	30.6	7.5	-62.0	-12.9
S200	Taproot	5.0	4.4	-57.1	-14.7

sinks (Gombert *et al.*, 2007). Except for the genotypes Capitol under N100 and Saturnin under N200 conditions, post-flowering N uptake was observed (Figure III.2), accordingly with previous studies (Schjoerring *et al.*, 1995; Hocking *et al.*, 1997; Rossato *et al.*, 2001, Barlog and Grzebisz, 2004; Malagoli *et al.*, 2005). The high plant demand of N during grain filling could stimulate the post-flowering N uptake, when environmental conditions are favourable, i.e. no water deficiency and/or mineral N available in the soil (Malagoli *et al.*, 2004).

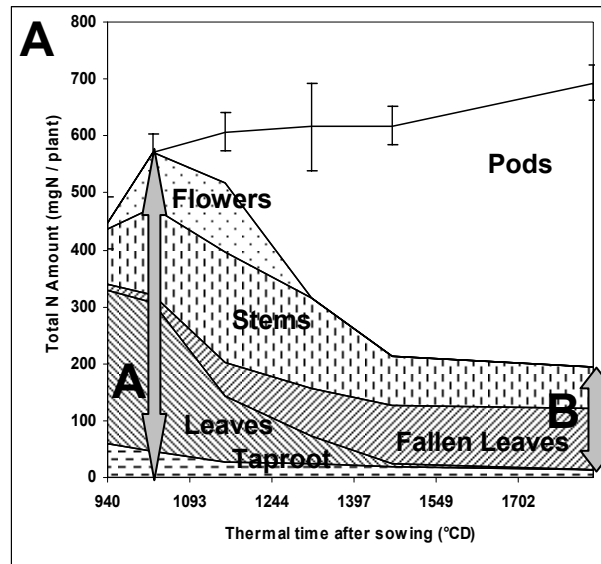
The pattern of N accumulation in the different organs responded more to the N dose than to genotype (Figures III.3 and 4). As reported by many authors, green leaves are the major sink organs during stem extension, then stems become the major N sink followed by pods until maturity (Hocking *et al.*, 1997; Chamorro *et al.*, 2002; Barlog and Grzebisz, 2004; Malagoli *et al.*, 2005).

The partitioning of N taken up was relatively similar among genotypes in stems or taproot, which represented about 32-39% and 4-12% of the total N taken up, respectively (Table III.1). On the opposite, the partitioning of N in leaves and pods showed significant differences between genotypes and was directly linked to the pattern of N uptake (Figure III.2). For example, the extremely low allocation (4.2%) of N taken up to pods for the genotype Saturnin under N200 conditions was explained by nearly an absence of post-flowering N uptake.

It is interesting to note that a genotype which had accumulated plenty of N before flowering, e.g. Saturnin under N200 conditions, reached a similar plant N amount at maturity compared to the genotypes Capitol and Pollen which displayed post-flowering N uptake (Figure III.2). Only a few publications have dealt with the genotypic effect on N dynamics in oilseed rape. A recent study at the vegetative stage showed that similar N uptake among genotypes reflected in fact differences in N content setting off by differences in plant biomass (Svecnjak and Rengel, 2006). Moreover, Kamh *et al.* (2005) observed that higher N uptake efficiency of a “N-efficient” genotype was due to a higher root growth rather than higher uptake per unit of root length. However, despite its major role in the N dynamics of the plant, the root system remains very difficult to study under field conditions.

D.2 N Remobilization

At maturity, 63-89% of the pod N was derived from the remobilization of N from vegetative tissues (calculated from table III.1). Schjoerring *et al.* (1995) and Diepenbrock (2000) reported that 70% of the N contained in stems and pod walls at mid-flowering was remobilized to seeds. Others studies underlined the major role of N remobilization for N pod filling in oilseed rape (Hocking *et al.*, 1997; Rossato *et al.*, 2001; Chamorro *et al.*, 2002; Malagoli *et al.*, 2005). The



B	Apparent NRE	Real NRE	NTE
C100	68.8% ±1.2	62.5% ±5.7	52.4% ±1.5
P100	74.9% ±1.1	56.8% ±7.7	59.7% ±1.5
S100	67.1% ±1.0	93.0% ±5.1	48.2% ±3.0
C200	57.1% ±2.0	72.5% ±10.0	65.6% ±2.6
P200	63.2% ±1.8	72.6% ±9.7	48.9% ±0.6
S200	64.1% ±0.9	102.9% ±6.5	20.0% ±1.6

C	NHI	NHI (+ FL)	NUtE
C100	70.4% ±1.7	59.7% ±1.8	27.4 ±0.9
P100	75.1% ±0.8	69.1% ±1.1	26.6 ±1.1
S100	79.2% ±0.9	70.0% ±0.7	27.7 ±1.0
C200	68.8% ±1.9	58.8% ±2.2	20.1 ±1.3
P200	71.2% ±1.0	59.8% ±1.4	23.4 ±1.2
S200	74.5% ±1.6	61.2% ±1.7	22.3 ±1.2

Figure III.7: Apparent and real N remobilization efficiencies (NRE), N translocation efficiency (NTE), N Harvest Index (NHI) and N Harvest Index taking into account the Fallen Leaves (NHI + FL) and N Utilization Efficiency (NUtE), in three field-grown *Brassica napus* genotypes ‘Capitol’ (C), ‘Pollen’ (P) and ‘Saturnin’ (S), under two levels of N fertilization: 100 and 200 kg N ha⁻¹. Data are means ± standard deviation for n=6. See ‘Materials and Methods’ for calculations.

genotypic effect observed in our study was directly linked to the pattern of N uptake (Figure III.2). The contribution of N remobilization was higher (over 80%) in the genotypes that did not display post-flowering N uptake. How these processes are (co-) regulated remains unknown.

Whatever the N treatment and the genotype, green leaves contributed to the largest part of remobilized N (42.9-59.6%), followed by stems (31.5-40.1%) and taproot (less than 20%, Table III.1). These data confirmed previous results on N remobilization (Schjoerring *et al.*, 1995; Hocking *et al.*, 1997; Rossato *et al.*, 2001; Chamorro *et al.*, 2002; Barlog and Grzebisz, 2004; Malagoli *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2005). However, our study did not inform about the exact contribution of each organ to seeds N. According to Schjoerring *et al.* (1995), leaves, stems and pod walls contribute for one third of the final N amount of seeds under high N supply conditions. The N remobilization efficiency of pod walls is known to be over 75% (Hocking and Mason, 1993; Schjoerring *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1991; Hocking *et al.*, 1997). Our heavy field experiment did not allow us to separate pod walls and seeds (except at maturity), but it would have been relevant to compare the N remobilization efficiency of pod walls between genotypes.

N remobilization from green leaves occurred earlier than from stems (Figures III.3 and 4), presumably due to the senescence of lower leaves induced by shading, as reported by Hocking *et al.* (1997). Thus, N remobilized from green leaves was available before the beginning of pod development (Figures III.3 and 4). A part of this remobilized N could be stored in the taproot as a 23 kDa vegetative storage protein and in the stems and then remobilized during grain filling (Rossato *et al.*, 2001; 2002). Malagoli *et al.* (2005) showed that the N remobilized from lower leaves was mainly allocated to the stems and new top leaves. Because of the complexity to study the root system under field condition, most of studies focus on the above ground plant parts and little is known about N dynamics of roots and taproot. However, our results showed that the taproot contribution can reach about 20% of the total pool of remobilized N (Table III.1), with a major remobilization during stem extension and flowering (Figures III.3 and 4). It is interesting to note the higher taproot contribution under N100 than N200 conditions and the genotypic variation. As oilseed rape yield is more frequently source limited and increasingly source limited from low to high N supply (Pechan and Morgan, 1985; Wright *et al.*, 1988; Schjoerring *et al.*, 1995; Dreccer *et al.*, 2000), it would be relevant to increase the storage of N coming from remobilization of lower senescing leaves in buffer organs like taproot and stems.

Another way would be to focus on leaf area. The N treatment increases the photosynthetic surfaces without affecting the efficiency of photosynthesis (Gammelvind *et al.*, 1996). Our results showed an increased leaf area index (LAI) with the N supply independently of the genotype and also, an increased duration of the LAI (data not shown). Moreover, Grosse *et al.*

(1992; cited by Diepenbrock, 2000) found close genotypic correlations between the duration of LAI until flowering and seed yield. Thus, it appears relevant to improve the duration of LAI until pod development to better synchronize the N source and sink capacity of the plant.

D.3 Fallen leaves

The major part of the leaves was already fallen before pod development independently of N dose or genotype (Figure III.5A). In oilseed rape, leaf senescence starts at the bottom of the canopy and moves upwards. Thus, the basal and larger leaves that are gradually shaded by top newly grown leaves, wilt first and the last remaining leaves are high in the canopy, i.e. on the axillary's racemes.

Surprisingly, the genotype Saturnin displayed a declining gradient of residual N content from the uppermost to the basal fallen leaves (Figures III.5B and 5C). The opposite was true in others genotypes underlying a better synchronization between the senescence of the uppermost leaves and the pod filling, making N remobilization more efficient, as reported by Malagoli *et al.* (2005).

Whatever the N treatment, the genotype Pollen displayed a lower final cumulative dry weight of fallen leaves than others genotypes (Figure III.5A). Under N100 conditions, this low dry weight combined to a low N content (Figure III.5B) resulted to a lower amount of N lost through leaf fall ($25.6 \text{ mg N plant}^{-1}$) than others genotypes (Figure III.6A). Under N200 conditions, the higher N amount of the genotype Saturnin ($107.4 \text{ mg N plant}^{-1}$) was due to high values of both dry weight and N content in the fallen leaves (Figures III.5A and 5C, respectively). Thus, even if the residual N content is considered as a good indicator of the N remobilization efficiency of the leaves, it cannot be sufficient to compare genotypes. The estimated amount of N lost by fallen leaves per hectare increased with the N dose and the differences observed among genotypes reflected the ones observed at the scale of the plant. Under N100 conditions, the lowest value was observed with the genotype Pollen ($15.9 \text{ kg N ha}^{-1}$) while the genotype Saturnin displayed the highest value ($52.5 \text{ kg N ha}^{-1}$) under N200 conditions. These results indicate that the amounts of N lost by leaf fall are significant and varied with genotypes, suggesting that leaf N remobilization could be improved and taken into account in breeding programmes.

D.4 Agronomic overview

Genotypic differences in N indexes were mainly observed with the apparent and real N remobilization efficiency (NRE) and the N translocation efficiency (NTE). Thus, these indexes appear to be better than NHI and NUtE to compare genotypes (Table III.1), probably due to their

direct link to the N dynamics through the plant during the whole studied period. Thus, it is interesting to note that a genotype displaying an efficient N remobilization (as Saturnin, Figure III.7) did not present higher N utilization efficiency than others genotypes.

This study demonstrates the complexity of plant N economy and points out the importance of having an integrative view of processes occurring at different scales. Thus, improving the duration of LAI could counterbalance the N source limitation during pod development and could also improve leaf N remobilization. Such approach requires taking into account leaf senescence and its regulation in interaction with light and carbon metabolism (for a review, see Wingler *et al.*, 2006).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Conseil Régional de Basse-Normandie and the Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM) for Julie Gombert's PhD grant. We are grateful to the technical staff of Caen (A Bré, M Coustenoble, MP Bataillé, P Beauclair, D Ballois and F Meuriot) and Grignon (E Fovart, J Rodrigues, F Lafouge and A Savin) for their massive help during the whole experiment. We thank Dr Laurence Rossato for her help in the preparation of the field experiment. This work was supported by a grant from PROMOSOL.

Chapitre IV

Chapitre IV. The expression patterns of *SAG12/Cab* genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to environment.

Running title: Progression of leaf senescence in oilseed rape

Julie GOMBERT¹, Philippe ETIENNE¹, Alain OURRY¹ and Frédéric LE DILY^{1,2}

1 – UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S. Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

2 – Corresponding author: F. Le Dily

Phone: (33) 231 565 524

Fax: (33) 231 565 360

Email: frederik.ledily@unicaen.fr

Journal of experimental botany, 57, 1949-1956, 2006.

KEY WORDS: *Brassica napus* L., chlorophyll, leaf senescence, Senescence-Associated Genes, Senescence-Down-regulated Genes, soluble proteins.

RESUME :

- **Contexte et objectifs** Malgré une forte capacité d'absorption du nitrate, le NUE (Nitrogen Use Efficiency) du colza est faible en raison d'une remobilisation inachevée de l'azote des organes végétatifs (en particulier les feuilles) vers les organes en croissance. Ainsi, cette culture nécessite de forts niveaux d'intrants et les feuilles chutent avec une teneur élevée en azote. Afin de réduire le niveau de fertilisation azotée et d'améliorer le bilan environnemental du colza, de nouveaux génotypes pourraient être sélectionnés sur leur capacité à remobiliser l'azote foliaire.
- **Méthodes** Différents indicateurs de la sénescence foliaire chez le colza ont été analysés au cours d'une sénescence liée au développement, ainsi qu'au cours d'une sénescence induite par une privation en azote. Les changements métaboliques dans les feuilles d'âge croissant ont été suivis chez des rosettes alimentées ou non en azote, en mesurant les teneurs en chlorophylles, en azote total et en protéines solubles. De manière similaire, l'expression de gènes connus pour être induits (*SAG12*) ou réprimés (*Cab*) durant la sénescence a été suivie.
- **Résultats clés** La quantité de protéines solubles par feuille s'avère être un meilleur indicateur de la sénescence foliaire que les teneurs en chlorophylle ou en azote total, mais ne constitue pas un indicateur précis en condition de carence azotée. Par contre, l'induction de l'expression du gène *SAG12* et la répression concomitante du gène *Cab* permet de suivre la progression spatio-temporelle de la sénescence foliaire chez le colza.
- **Conclusion** Cette étude montre, pour la première fois à l'échelle de la plante entière, que les expressions des gènes *SAG12/Cab* dans les feuilles coïncident avec la transition source-puits pour l'azote au cours d'une sénescence foliaire liée au développement, ou induite par une privation en azote.

ABSTRACT

➤ **Background and Aims** Despite a high nitrate uptake capacity, the nitrogen use efficiency (NUE) of oilseed rape is weak due to a relatively low N remobilization from vegetative (mostly leaves) to growing parts of the plant. Thus, this crop requires high rate of N fertilization and leaves fall with high N content. In order to reduce the rate of N fertilization and to improve the environmental impact of oilseed rape, new genotypes could be selected on their capacity to mobilize the foliar N.

➤ **Methods** Various indicators of leaf senescence in oilseed rape were analyzed, during plant growth, as well as during a N deprivation induced senescence. Metabolic changes in leaves of increasing age were followed in N-supplied and N-deprived rosettes by measuring chlorophyll, total N and soluble protein contents. Similarly, the expression of genes known to be up-regulated (*SAG12*) or down-regulated (*Cab*) during leaf senescence was monitored.

➤ **Key Results** The amount of soluble proteins per leaf was a better indicator of leaf senescence than chlorophyll or total N content but was not evaluated as an accurate indicator under N-deprived conditions. On the other hand, up-regulation of *SAG12* concomitantly with down-regulation of *Cab* in leaf revealed the spatial and temporal progression of leaf senescence in oilseed rape.

➤ **Conclusion** This study shows for the first time at the whole plant level, that the *SAG12/Cab* gene expressions match the sink/source transition for N during both developmental and nutrient stress-induced leaf senescence.

A Introduction

Nitrogen (N) and other mobile elements are redistributed in higher plants from vegetative plant parts (sources) to growing organs or storage tissues (sinks). One of the major features of the progression of leaf senescence is the mobilization of N products that are readily translocated as nutrients to N sinks (Feller and Fischer, 1994; Masclaux *et al.*, 2000).

During the development of reproductive tissues, the N demand by the reproductive sink organs greatly increases. In senescing leaves, the export of N products is not compensated by the N import and then leads to the decrease of the N content. In contrast, when the reproductive organs have been removed in *Brassica napus*, the foliar senescence is slowed down due to the absence of a significant sink demand (Noquet *et al.*, 2004). In this case, the export of N from the senescing leaves is reduced and therefore leads to a higher N content in the fallen leaves. In oilseed rape, the low N demand at the vegetative stage of development (i.e. before the development of reproductive organs) may explain the high N content remaining in the fallen leaves (Triboï-Blondel, 1988 ; Hocking *et al.*, 1997 ; Rossato *et al.*, 2001).

High N use efficiency (NUE: ratio of harvested N to N fertilization) is partly a question of highly coordinated timing of N distribution to the locations of greatest N demand within the plant (Masclaux *et al.*, 2000). Therefore, leaf fall is of considerable interest because N remaining in prematurely fallen leaves is a loss for dry matter production but also may increase nitrate leaching following the mineralization of leaf organic N. Due to a low NUE, oilseed rape requires high rate of N fertilization, which is too high in regards to the N content of harvested tissues. Whatever the rate of N fertilization, the oilseed rape N harvest index is low as compared to cereals (Dreccer *et al.*, 1997). The fall of the leaves with a high N content (up to 4,5% of the dry matter) leads to a return of N to the soil that can reach 100 Kg N. ha⁻¹ (Dejoux *et al.*, 2000). Therefore, new genotypes of oilseed rape selected for their capacity to mobilize the foliar N would require a lower N fertilization with a potential improvement of the environmental impact of this crop.

Leaf senescence progresses in an age-dependent manner. In *B. napus* and other annual plants, such as wheat and rice (Feller and Keist, 1986), the lower old leaves wilt first and the uppermost younger leaves remain active for a longer time so that senescence starts at the bottom of the canopy and moves upwards. Along the axis of the young rosette of *Brassica napus*, each leaf can easily be ranked and a single plant provides a large set of leaves with a gradation of N mobilization rate. Based on a weekly ¹⁵N labeling in field conditions during oilseed rape growth cycle, Malagoli *et al.* (2005) gave an accurate description of N flows from or to each individual

leaf rank. Although a general description can be obtained for all leaf ranks, this study revealed a complex system of sink/source transitions for all leaves. N for leaves located at the bottom of the canopy mostly comes from concurrent nitrate uptake, before being remobilized to upper located leaves during the plant life span. A single N atom can therefore be mobilized several times from leaves to leaves being finally used for seed filling. Overall, these results showed that lower leaf ranks were, during vegetative growth, less efficient in term of N mobilization, having therefore a different behavior than leaves in the upper canopy, for which a large proportion of their N content is translocated to reproductive sinks. However, this approach is far too heavy to use if a comparison between numerous genotypes under different environments is expected, for which more easily accessible indicators of N mobilization during N senescence are requested.

Leaf senescence is a succession of many physiological and molecular events that arise according a three-stage process (Noodén *et al.*, 1997), comprising an initiation phase (sink/source transition), a degenerative phase (disassembly of cellular components) and a terminal phase (loss of cell integrity and cell death) (Yoshida, 2003). But leaf senescence is not only an essential step for plant development since it can also be prematurely induced by numerous environmental stresses (Gan and Amasino, 1997). Nutrient stress, such as N limitation, induces premature senescence in the N deprived plants (Smart *et al.*, 1994). During leaf ageing or under environmental stress, various physiologic and molecular indicators have been used to characterize the initiation phase of leaf senescence that reflects the status of source or sink of the leaf for N (Yoshida, 2003). Because one of the earliest feature of leaf senescence is the decline of photosynthesis, yellowing is often used as an obvious macroscopic symptom of senescence. Nevertheless, visible yellowing is a relatively late event and many senescence-enhanced genes show increased expression before leaf yellows (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997). Senescence-enhanced genes that encode different types of proteins, including proteases, lipases, nucleases and N metabolizing enzymes, have been isolated from *B. napus* leaves and expression analyses have shown that the induction of expression does not occur at the same stage of senescence (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Among these, Senescence-Associated Genes (SAG) are expressed only during developmentally controlled senescence. For example, in *Brassica napus*, *SAG12*, a putative cysteine protease, is encoded by two genes *BnSAG12-1* and *BnSAG12-2* (Noh and Amasino, 1999), which are orthologues of *SAG12* from *Arabidopsis thaliana* (Lohman *et al.*, 1994). Both genes show the same temporal expression pattern during the senescence process: no expression of these genes in young or mature leaves followed by an expression level of both genes that reach a maximum in early stage of senescence and then a slight decrease in the degenerative

phase that remain at the same level in the terminal phase of senescence. Other genes, such as *LSC54* (Leaf Senescence Clone encoding a metallothionein), are expressed during all stages of *Brassica napus* leaf development but their expression increased significantly during the senescence process (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997). On the other hand, the expression of Senescence-Down-regulated Genes (SDG) such as those involved in photosynthesis and also in the structure of the chloroplast, decreases during leaf senescence (Hensel *et al.*, 1993). For example, the expression of the *Cab* gene (chlorophyll a/b binding protein) decreases in the fully expanded leaves and is no more expressed in the senescing leaves (Buchanan-Wollaston, 1994).

The aim of this work was to compare various indicators of senescence in order to find the ones that are able to spatially and temporally characterize the sink/source transition of an oilseed rape leaf during growth as well as during an induced senescence. Thus, metabolic changes in leaves of increasing age from N-supplied or N-deprived rosettes were examined by measuring chlorophyll, total N and soluble protein contents. In addition, the expression pattern of genes known to be up-regulated (*SAG12*) or down-regulated (*Cab*) during leaf senescence was established.

B Materials and methods

B.1 Plant culture

Seeds of *Brassica napus* L. cv Capitol were germinated and grown in hydroponic solution (30 seedlings per 15 l plastic tank) in a greenhouse. The aerated nutrient solution contained 1mM KNO₃, 0.40 mM KH₂PO₄, 1.0 mM K₂SO₄, 3.0 mM CaCl₂, 0.50 mM MgSO₄, 0.15 mM K₂HPO₄, 0.20 mM Fe-Na EDTA, 14 μM H₃BO₃, 5.0 μM MnSO₄, 3.0 μM ZnSO₄, 0.7 μM CuSO₄, 0.7 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.1μM CoCl₂ and was renewed every two days. pH was maintained at 6.5 ± 0.5 by adding CaCO₃ (200 mg L⁻¹). The natural light was supplemented with phytol lamps (200 μmoles m⁻². s⁻¹ of photosynthetically active radiation at the height of the canopy) for 16 hours per day. The thermo-period was 20°C (day) and 15°C (night). Time was expressed in cumulative degrees days after sowing (°C DAS).

B.2 Experimental treatments and sampling

The period of growth that was studied began at 308°C DAS and ended at 548°C DAS. At 308°C DAS, one set of plants was transferred on a solution without KNO₃ and was grown under N-deprivation conditions until the end of the experiment.

On each date (308, 357, 436 and 548 °C DAS), three plants of both set (N-supplied and N-deprived plants) were harvested and divided as the whole root system, the stem and individual leaves. Relative chlorophyll content of each leaf was determined using a SPAD analyzer (see below). The plant fractions were randomly subsampled. One subsample of each plant fraction was weighed, dried at 60°C, reweighed for dry weight determination and then ground as a fine powder for nitrogen analyses. A second subsample was immediately frozen in liquid nitrogen after harvest and then stored at -80°C until protein and RNA extractions.

B.3 Nitrogen analysis

The total N in the plant samples was determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy).

B.4 Chlorophyll Content

Relative chlorophyll content per unit of leaf area was determined using a non-destructive chlorophyll meter SPAD (Soil Plant Analysis Development) analyzer (Minolta, model SPAD-502), which measures leaf transmission at two wavelengths (650 and 940 nm). It has been demonstrated that relative SPAD values depend on chlorophyll content in a linear manner (Monje and Bugbee, 1992). Each data point represents the average of 8 independent measurements on each leaf.

B.5 Soluble proteins extraction and quantification

Soluble proteins were extracted from 500 mg fresh weight of frozen leaf tissue at 4°C with 2 ml of potassium phosphate buffer 100 mM, pH 7.5. The homogenate was centrifuged (2000 g, 4°C, 5 min) and supernatant was collected. An aliquot of this supernatant were used for protein quantification with Bradford's method (Bradford, 1976). BSA was used as the standard for the quantification. For each sample, three quantifications were made.

B.6 RNA extraction

Total RNA was extracted from 500 mg fresh weight of frozen leaf tissue. Leaf material was ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was mixed with 750 µl extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750 µl of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 sec. After addition of 750 µl of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 20000 g for 5 min at 4°C. One volume of 4 M LiCl solution was added to the supernatant and the mix was incubated overnight at 4°C. After centrifugation (20000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 µl of sterile water. 50 µl of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 ml of 96% ethanol were added to precipitate total RNA for 1 h at -80°C. After centrifugation (20000 g, 20 min, 4°C), the pellet was washed with 1 ml of 70% ethanol (v/v), then centrifuged at 20000 g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was dried and re-suspended in sterile water containing 0.1 % SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was realized by spectrophotometry at 260 nm (Optiquant, Pharmacia Biotech, France) before use in RT-PCR analyses.

B.7 RT-PCR analysis

For RT-PCR, 3 µg of total RNA was converted to cDNA with MLV reverse transcriptase using the manufacturer's protocol (Promega, France). From each sample, two RT reactions were made and followed by two independent PCRs using specific primers for *Brassica napus Cab* gene LHCII type I (AY288914) (Forward primer: 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3' and reverse primer 5'-CCTCCITCGCTGAAGATCTGT-3') and primers shared by *SAG12-1* (AF089848) and *SAG12-2* ([AF089849](#)) genes of *Brassica napus* (Forward primer: 5'-GGCAGTGGCACACCAICCGGTTAG-3' and reverse primer 5'-AGAAGCITTCATGGCAAGACCAC-3'). All of PCRs were performed with Qiagen Taq polymerase (France) for 35 or 18 cycles respectively for *SAG12* and *Cab* genes: 1 cycle at 94°C for 10 min, 35 (*SAG12*) or 18 (*Cab*) at 94°C for 1 min, 58°C for 45 sec, 72° C for 1 min and 1 cycle at 72°C for 10 min. Three single 267 bp and 290 bp cDNAs were amplified using respectively specific primers of *SAG12* and *Cab* genes. The identity of the amplified fragments was checked by sequencing (Genome Express, France). For all RT-PCR reactions, *25S rRNA* (D10840) was used as a cDNA synthesis and amplification control. RT-PCR products were separated by electrophoresis through 1% agarose gel. Agarose gel was visualized and photographed using a Biocapt (Vilber Lourmat, France). Each PCR product was quantified using bio 1-D software and normalized using intensity of *25S rRNA* signal.

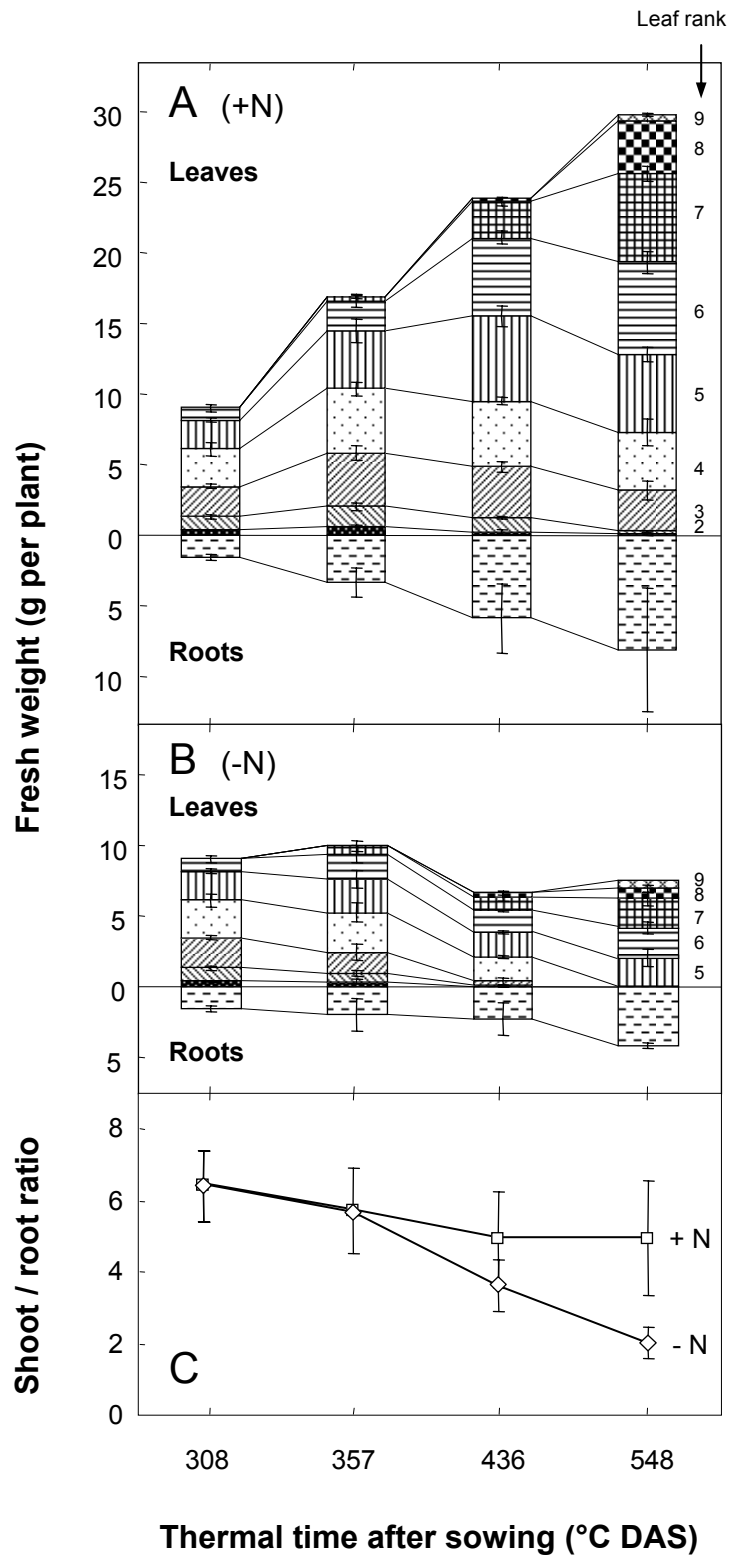


Figure IV.1: Leaf and root fresh weights in N-supplied (A) and in N-deprived (B) plants further separated into root (☐) and leaf rank 1 (▀), 2 (▄), 3 (▧), 4 (▨), 5 (▩), 6 (▪), 7 (▬), 8 (▮) and 9 (▯). Shoot/root ratio (C) in N-supplied (□) and N-deprived (◇) plants. Each box represents the fresh weight of each individual leaf and the root system per plant. Error bars represent standard deviation for $n=3$ when larger than the symbol.

C Results

C.1 Changes in fresh weight of leaves and roots

During plant development, new leaves appeared at the top of the plant while lower leaves entered into senescence. In N-supplied plants, the total fresh weight of leaves increased with time, as well as the root fresh weight (Figure IV.1A). The fresh weight of the middle and top leaves (leaf ranks 6 to 9) increased with time whereas it decreased at the base, thus underlying the senescence process in the lowest part of the canopy, resulting from a concomitant decrease in water content and dry weight. In N-deprived plants, the total fresh weight of leaves remained to the same value until 357°C DAS (Figure IV.1B) and then decreased as a result of smaller size leaves and the progressive fall of leaf ranks 1 and 2 (between 357 and 436°C DAS), and leaf rank 3 (between 436 and 548°C DAS). By contrast, the fresh weight of roots increased until the end of the experiment (548°C DAS). Consequently the shoot/root ratio remained to about 6 in N-supplied plants whereas it decreased from about 6 to 2 in N-deprived plants, mostly due to the root growth (Figure IV.1C). Thus, N-deprivation reduced leaf more than root growth compared to N-supplied plants.

C.2 Changes in chlorophyll content in individual leaves

Data of chlorophyll content in individual leaves, commonly used as an indicator of leaf senescence, are shown in Figure IV.2. In N-supplied plants, leaf chlorophyll content stayed relatively constant during the entire experiment for all leaves, except for older leaves (leaf ranks 1, 2 and 3) and new formed leaves (leaf ranks 7, 8 and 9) which decreased and increased, respectively (Figure IV.2A). Chlorophyll content was at its maximum value in the middle and mature leaves. Leaf chlorophyll content in older leaves decreased earlier in N-deprived plants than in N-supplied plants (Figure IV.2B). Chlorophyll content in leaf ranks 5 to 9 was quite similar in N-supplied and N-deprived plants. With regard to chlorophyll content, senescence of leaf ranks 1, 2 and 3 was accelerated by N deprivation and, in addition, this treatment promoted senescence in the leaf rank 4.

C.3 Changes in the amount of protein in individual leaves

In N-supplied plants, the amount of soluble proteins always displayed a symmetrical repartition around the median leaf ranks (Figure IV.3), with lower values in senescing (N sources) and new-formed (N sinks) leaves, and a maximum in mature leaves. Thus, these median

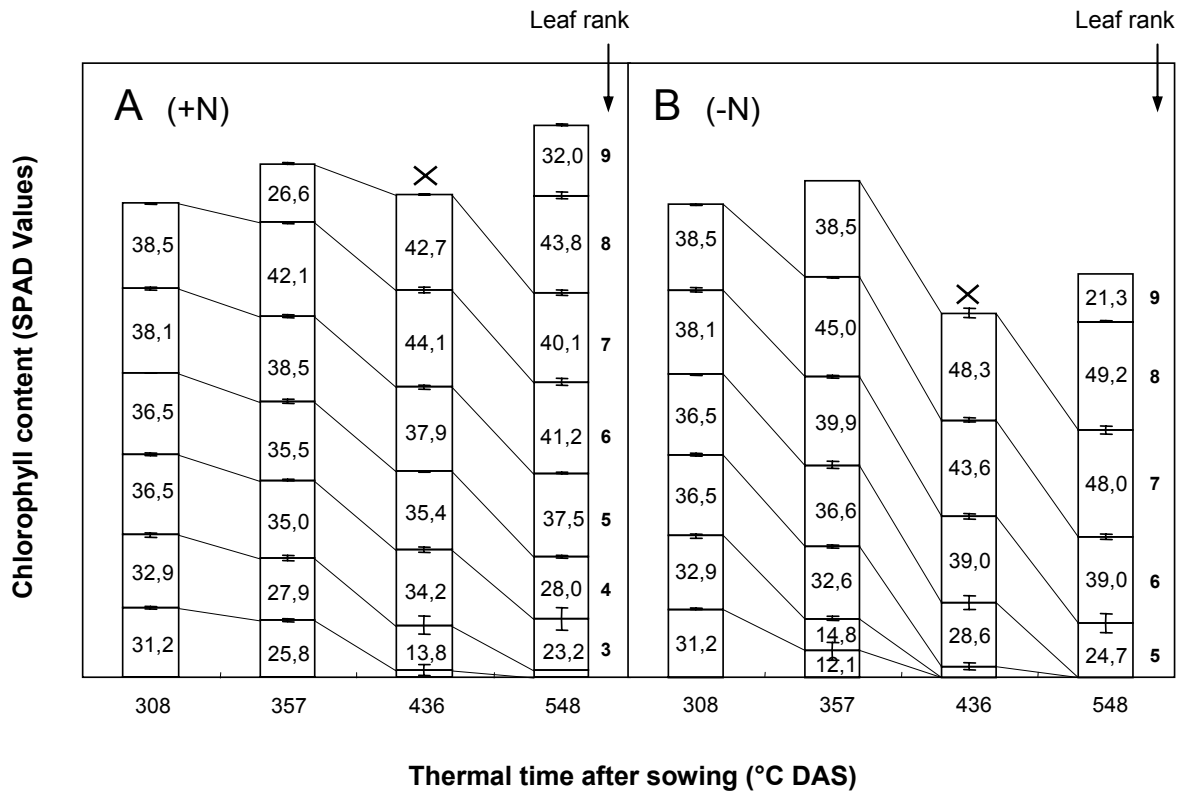


Figure IV.2: Leaf chlorophyll content in N-supplied (A) and N-deprived (B) plants. Total chlorophyll was analyzed with a SPAD analyzer as described in Materials and Methods. Each box represents the chlorophyll content of each individual leaf. Error bars represent standard deviation for $n=3$ when larger than the symbol. **X** The surfaces of the last leaf ranks are too small to be measured.

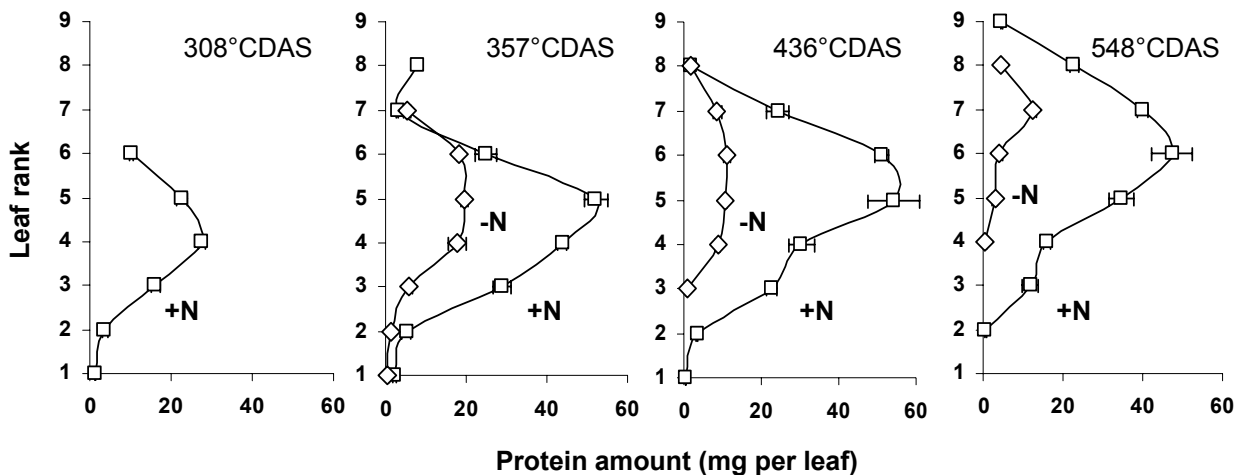


Figure IV.3: Amount of soluble protein in individual leaf rank in N-supplied (□) and N-deprived (◇) plants during time after sowing. Error bars represent standard deviation for $n=3$ when larger than the symbol.

leaves constituted the most important reserve of endogenous N (soluble proteins) of the plant. In N-deprived plants, the pattern of protein amount was similar as in N-supplied plants until 436°C DAS. Nevertheless, protein amounts were drastically reduced in all leaves, including new formed ones, beyond approximately 50%, 75% and 90% of N-supplied values at 357°C DAS, 436°C DAS and 548°C DAS, respectively. These reduced amounts in proteins were due, at least in part, to the lower leaf biomasses (Figure IV.1) and also to the lower N content in N-deprived plant leaves (data not shown).

C.4 Changes in expression of genes affected by leaf senescence

The expression of two genes (*SAG12*, cystein protease and *Cab*, chlorophyll a/b binding protein) that reflect leaf senescence stage in *Brassica*, was monitored. The kinetics of gene expression (Figure IV.4) were studied in the leaf rank 4 that was chosen because of the changes in physiological (Figure IV.1) and biochemical (Figures IV.2 and 3) indicators of senescence previously observed. *Cab* was constitutively expressed at 308°C DAS in both plants but down-regulation occurred earlier in N-deprived plants (436°C DAS versus 548°C DAS). In opposite the previous gene, *SAG12* was only expressed during leaf senescence. In the leaf rank 4, *SAG12* was expressed at 548°C DAS and 436°C DAS in N-supplied and N-deprived plants, respectively. In addition, the up-regulation of *SAG12* occurred concomitantly with the down-regulation of *Cab* whatever the N treatment, but earlier under N-deprivation condition. The up-regulation of *SAG12* and down-regulation of *Cab* indicated that the leaf rank 4 senesced earlier under N-deprivation conditions. This new indicator followed a drastic decrease of N amount per leaf (Figure IV.4) suggesting that it could be proposed, whatever the developmental stage, to identify leaf ranks subjected to sink/source transition for N (Figure IV.5A). Thus, we attempted to identify at each harvest date, the leaf rank characterized by both up-regulation of *SAG12* and down-regulation of *Cab* (Figure IV.5B). *SAG12/Cab* genes expression allowed identifying a theoretical leaf rank located on node 2.2 as a leaf which mobilized N at the beginning of the experiment (308°C DAS). It appeared that with time, foliar senescence of N-supplied plants progressed spatially toward the apex of the plant to reach the theoretical leaf rank 3.3 at 548°C DAS. In N-deprived plants, the spatial progression of leaf senescence was accelerated and reached the theoretical leaf rank 5.5 at 548°C DAS. From the linear correlations (Figure IV.5B) observed during early vegetative growth, the temporal senescence progression of one leaf ranked every 169,49°C D for N supplied plants while it progressed at a faster rate under N deprivation conditions (one leaf rank every 71,42°C D).

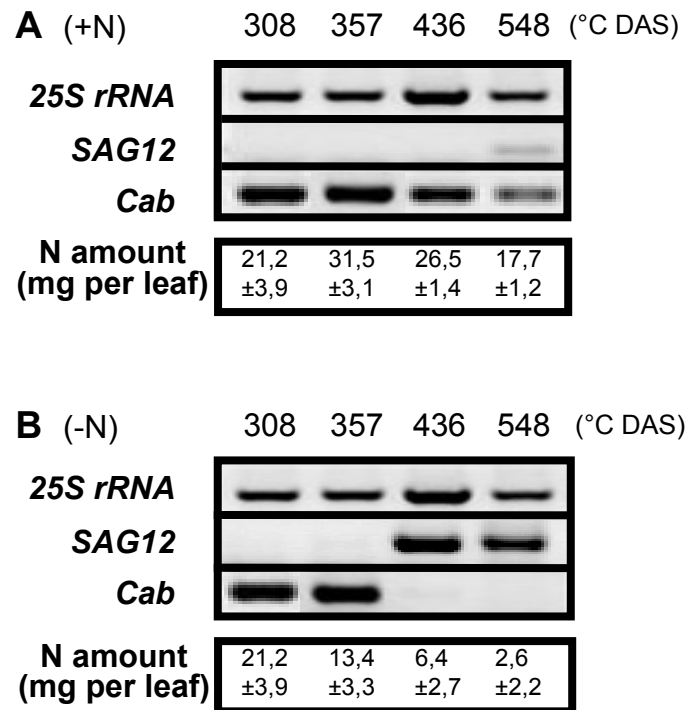


Figure IV.4: RT-PCR analysis of *SAG12* and *Cab* gene expression in the leaf rank 4 of N-supplied (A) and N-deprived (B) plants. Total RNA was extracted from the leaf rank 4 at 308, 357, 436 or 548 °C DAS after N-supply or N-deprivation. *25S rRNA* was used as a cDNA synthesis and amplification control.

D Discussion

D.1 Metabolic indicators of leaf senescence

In most studies of leaf senescence, chlorophyll content is used as a relevant metabolic indicator of the late stages of senescence (Buchanan-Wollaston 1994; Lohman *et al.*, 1994; Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Lee *et al.*, 2001). In contrast to many other investigations, we measured the chlorophyll content in each individual leaf of the plant. Whatever the rate of N fertilization, the chlorophyll content was lower in the lowest leaves of the plant and gradually increased in the top leaves. This confirms that in rape, as in other annual plants such as wheat, rice and tobacco (Dalling *et al.*, 1976; Mae and Ohira, 1981; Masclaux *et al.*, 2000), leaf senescence during vegetative development is a sequential process starting at the bottom of the canopy, and moving upwards. In contrast to the obvious differences in dry matter production between N-supplied and N-deprived plants, very few changes were observed in the chlorophyll content under N deprivation conditions. This result is in agreement with the observation of Kappen *et al.* (1998) that reports the absence of N fertilization effect on leaf chlorophyll content of field grown oilseed rape. Nevertheless, leaf senescence, and also leaf fall, occurred earlier in N-deprived plants than in N-supplied plants. Thus, it appears that chlorophyll content in oilseed rape leaves is probably not a convenient metabolic indicator of leaf senescence, especially under N-deprived conditions, even if it is still often used to characterize a group of leaves at the same stage of development (Buchanan-Wollaston, 1994).

The highest amount in soluble proteins was observed in mature median leaves, decreased in lower leaves and reached a very low amount (closed to zero) in the lowest and oldest leaves. This result supports the hypothesis that during leaf senescence, the cell metabolism is shifted toward the breakdown of macro-molecules leading to a dramatic decrease in the amount of soluble proteins (Hensel *et al.*, 1993), therefore allowing a massive mobilization of N metabolites from leaves to the growing parts of the plant such as young leaves and developing seeds (Noodén, 1988; Smart *et al.*, 1994). In contrast to the chlorophyll content, N-deprivation affected the amount of soluble proteins in leaves as well as N content. The amount of soluble proteins of each leaf was reduced, especially because of a lower leaf biomass in N-deprived plants. Furthermore, the decrease in the amount of soluble proteins in old senescing leaves occurred earlier than in the N-supplied plants. Because the only source of N of N-deprived plant comes from senescing leaves, the breakdown of protein will have occurred earlier. The N data

confirmed this result, showing the high total N content in median leaf rank (LR 5 and 6) decreased in the low leaves and the new top leaf (data not shown).

Taken alone, chlorophyll content does not appear to be a reliable indicator of leaf senescence stage and nor of leaf N status. Our results are also supported by those of Crafts-Brandner *et al.* (1990) who showed that in leaf, the sink/source transition for N occurs earlier than chlorophyll breakdown, underlying a very early protein mobilization during leaf senescence. Thus, the amount of soluble proteins is probably a better indicator of leaf senescence than chlorophyll or total N content in oilseed rape. Finally, the results also confirm that the rate of leaf senescence and the mobilization of leaf N are related to the N nutrition status of the plant and to the sink/source transition (Crafts-Brandner *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 1999; Masclaux *et al.*, 2000). Nevertheless, the low amount of soluble proteins in the top new-formed leaves in N-deprived plants shows that it is impossible to discriminate a young leaf to an old one which has mobilized its N. Consequently, this metabolic indicator cannot be used as an indicator of leaf senescence.

D.2 Molecular indicators of leaf senescence

Leaf senescence is associated with important changes in gene expression. Many genes, especially genes involved in photosynthesis, are down-regulated (SDGs for senescence-down-regulated genes) while specific senescence-associated genes (SAGs) are up-regulated (Hensel *et al.*, 1993; Lohman *et al.*, 1994; Buchanan-Wollaston, 1994; Noodén *et al.*, 1997). This work focused on two genes, one down-regulated (*Cab*) and one up-regulated (*SAG12*). The chlorophyll a/b binding protein (*Cab*) is involved in photosynthesis and its gene expression decreases during leaf development (Buchanan-Wollaston, 1994; Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997). Thus, the expression of this gene was compared with the senescence related gene expression of *SAG12*. *SAG12* encodes a cystein protease in *Arabidopsis* and *Brassica napus* and is only expressed during developmentally controlled senescence (Lohman *et al.*, 1994; Weaver *et al.*, 1998; Noh and Amasino, 1999; Gbric *et al.*, 2003).

The expression pattern of *SAG12* and *Cab* genes showed temporal and spatial regulation in relation to the progression of leaf senescence along the axis of the plant. Furthermore, the transcript levels changed earlier in N-deprived plants than in N-supplied plants confirming the sensitivity of these two genes to a senescence-promoting treatment. It is interesting to notice that *SAG12* expression was enhanced under N deprivation although its specificity is to be controlled by a strictly developmental senescence regulatory pathway (Noh and Amasino, 1999). This result could be explained by our original approach to study individual leaf of the plant instead of grouping leaves with similar chlorophyll content, and/or by an early onset of a natural phase in

leaf development which therefore induces senescence. In addition, the up and down-regulation of *SAG12* and *Cab*, respectively, immediately shows in a leaf that the sink/source transition has already occurred, whereas the opposite is true for metabolic indicators (chlorophyll, protein and N amounts) which require kinetic measurements.

Thus, among the different indicators used in this study (metabolic and molecular), *SAG12* and *Cab* have proven the most accurate for following the temporal and spatial progression of leaf senescence in oilseed rape. Concomitantly with the down-regulation of *Cab*, the up-regulation of *SAG12* matches the sink/source transition for N during both developmental and induced leaf senescence (N deprivation). This supports the idea that the sink/source transition for N occurs earlier than leaf chlorophyll degradation, and matches the increase of proteolysis activities (Crafts-Brandner *et al.*, 1990).

As a conclusion, the concomitant up-regulation of *SAG12* and down-regulation of *Cab* seems to be an accurate bio-indicator of leaf senescence. Furthermore, this indicator will be used to monitor the gradient of leaf senescence during the ontogenetic cycle of oilseed rape, especially during the sink/source transition of the leaves required for grain N filling. This discriminating indicator should be useful to relate the timing of leaf senescence with a better NUE and therefore to compare oilseed rape genotypes on their ability to mobilize the foliar N.

Acknowledgements

The authors thank the Conseil Régional de Basse-Normandie and the Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM) for Julie Gombert's PhD grant. We are grateful to O. Sordet for his critical reading of the manuscript.

Discussion

Chapitre V. Discussion

A Améliorer l'efficacité de l'azote

Jusqu'à présent, la sélection du colza s'est essentiellement focalisée sur l'amélioration du rendement et de la qualité en huile sous des conditions supra optimales de fertilisation azotée (environ 200 kg N ha⁻¹). Cependant, dans un contexte de développement durable, l'impact environnemental des cultures doit être pris en compte, et à ce titre, la réduction de la fertilisation azotée peut constituer un objectif en soi. Désormais, l'objectif principal ne serait plus de sélectionner des génotypes présentant de bons rendements en réponse à une fertilisation élevée mais plutôt ceux caractérisés par une efficacité élevée de l'engrais azoté sous des conditions de fertilisation azotée raisonnable (<100 kg N ha⁻¹). Or, le comportement d'un génotype peut dépendre des conditions de disponibilité en azote. Chez le blé, des variétés naines très performantes sous des conditions optimales de croissance, perdent leur avantage agronomique en condition de fertilisation azotée réduite (Singh et Arora, 2001). Une étude récente chez le maïs (Uribelarrea *et al.*, 2006) montre comment une sélection reposant sur la teneur en protéines des grains, peut altérer l'efficacité de l'azote des plantes hybrides. Les variétés à haute teneur en protéines se caractérisent par une efficacité d'absorption de l'azote élevée alors que celles à faible teneur en protéines présentent une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote. Ainsi, même si les variétés étudiées présentent un NUE (N Use Efficiency) global similaire à maturité, l'étude des composantes du NUE (efficacité d'absorption et d'utilisation de l'azote) a révélé des stratégies différentes pour y aboutir, qui semblent très héréditaires chez les hybrides.

B Complexité de l'efficacité de l'azote

L'étude de l'efficacité des nutriments, dont l'azote, est particulièrement complexe car elle requiert l'intégration de multiples mécanismes ayant lieu à des échelles à la fois spatiales (participation d'organes différents) et temporelles (succession de phases de développement) différentes. Les interactions entre les dynamiques d'assimilation du nitrate et du dioxyde de carbone sont importantes. Les besoins en azote de la plante traduisent son activité métabolique,

et la synthèse protéique dépend de la disponibilité en acides aminés issus de l'assimilation combinée du nitrate et du dioxyde de carbone. La réponse du rendement à la fertilisation azotée est fonction de l'accumulation de l'azote dans la plante, qui a lieu essentiellement au cours de la phase végétative chez le colza, puis de la capacité de la plante à remobiliser l'azote des organes végétatifs vers les graines en développement. L'absorption, tout comme la remobilisation de l'azote, sont des processus finement régulés au sein de la plante et également soumis à une régulation par des facteurs environnementaux comme la température, le stress hydrique, le rayonnement...

L'efficacité de l'azote est généralement évaluée à l'aide d'indicateurs facilement accessibles (NHI, NUE) mais qui ne rendent pas compte des processus physiologiques sous-jacents. Une meilleure compréhension des processus associés au NUE et surtout à ses composantes (efficacité d'absorption et d'utilisation de l'azote) est essentielle pour améliorer les pratiques culturales et développer des programmes de sélection visant une meilleure efficacité de l'azote. Comme le souligne Lawlor (2002), le rôle crucial de l'azote dans l'agriculture moderne nécessite une compréhension approfondie de son métabolisme ne pouvant être obtenue sans une approche à la fois moléculaire, biochimique et physiologique.

C Efficienc e d'absorption de l'azote

L'efficacité d'absorption de l'azote (NUpE pour N Uptake Efficiency) représente la quantité d'azote absorbé par la plante rapportée à la quantité d'azote disponible (*i.e.* contenu dans le sol et apporté par fertilisation).

C.1 Absorption totale

Dès 1977, Yau et Thurling suggéraient une sélection reposant sur l'absorption totale d'azote. De nombreux travaux ont effectivement montré que le rendement et le NUE étaient fortement liés à l'efficacité d'absorption de l'azote. Le colza présente une efficacité d'absorption de l'azote qui n'est pas affectée par une augmentation du niveau de fertilisation azotée (de 0 à 150 kg N ha⁻¹, Chamorro *et al.*, 2002). Dans notre étude, nous avons observé un effet très significatif de la fertilisation azotée sur l'accumulation totale d'azote (Figures II.3 et III.2) alors qu'aucune différence entre les trois génotypes n'a été remarquée (Figure III.2). Une étude récente sur l'absorption démontre que les différences d'absorption entre deux génotypes contrastés (l'un considéré comme efficace pour l'azote, et l'autre non efficace) seraient en fait dues à des

différences de biomasse racinaire, le taux d'absorption par unité de surface racinaire étant similaire chez les deux génotypes (Kamh *et al.*, 2005).

L'accessibilité au système racinaire en condition de plein champ est extrêmement difficile, et nécessite de mettre en place une fosse permettant l'étude des profils racinaires. Pour des raisons purement logistiques, un tel dispositif ne pouvait pas être intégré à notre plan expérimental. En l'absence de toute observation, l'hypothèse de profils différents d'exploration racinaire entre les trois génotypes, selon le niveau de fertilisation azotée appliqué, ne peut être écartée. Chez le maïs, il a été montré que l'efficacité d'absorption de l'azote dépend de la capacité de la plante à absorber le nitrate présent dans les horizons profonds (60 à 150 cm). Chez le colza, Gabrielle *et al.* (2001) ont montré que 90% de l'absorption du nitrate avait lieu dans les 30 premiers cm. Le modèle d'absorption élaboré par Malagoli *et al.* (2004) prédit l'absorption à partir de la teneur en nitrate dans les 3 horizons du sol (0-30, 30-60 et 60-90 cm) et de la simple estimation de la biomasse racinaire à partir du ratio du pivot sur les racines latérales obtenu à partir de culture en hydroponie. Même si les sorties de ce modèle sont très correctes, une estimation de la biomasse racinaire au champ serait appréciable, en particulier lors de la comparaison génotypique.

Il est vrai qu'en raison de sa difficulté d'accessibilité en condition de plein champ, la contribution des racines latérales (biomasse, teneurs en azote) pour le calcul des indicateurs de l'efficacité de l'azote (NHI, NUpE...) a été négligée. Cependant, nous avons travaillé sur une méthode d'estimation de la biomasse racinaire reposant sur l'application foliaire d'urée marquée au ^{15}N , puis sur la mesure de la distribution du traceur dans le système racinaire. Malgré de bons résultats en conditions contrôlées, la dilution trop importante du ^{15}N dans le sol due en partie au faible flux phloémique vers les racines, ne nous a pas permis d'exploiter cette méthode dans nos expérimentations au champ. Cependant, l'importance du système racinaire mérite que de telles études soient développées.

C.2 Profil d'absorption de l'azote au cours du développement

L'étude du profil d'absorption au cours du cycle ontogénétique du colza permet d'évaluer les besoins de la plante en azote lors de son développement de manière à ce que la fourniture en azote soit ajustée en terme de quantité et de date(s) d'apport. Ainsi, de multiples études, dont la notre (Figures II.3 et III.2), ont montré que l'absorption d'azote est la plus élevée lors de la reprise de végétation et au début de la montaison (Wright *et al.*, 1988 ; Schjoerring *et al.*, 1995 ; Gabrielle *et al.*, 1998 ; Rossato *et al.*, 2001 ; Malagoli *et al.*, 2005a). La réduction de l'absorption observée lors de la floraison (Merrien *et al.*, 1988 ; Wright *et al.*, 1988 ; Jensen *et al.*, 1997 ; Gabrielle *et al.*, 1998 ; Rossato *et al.*, 2001 ; Chamorro *et al.*, 2002 ; Malagoli *et al.*, 2005a)

pourrait être la conséquence de l'ombrage important des feuilles par la mise en place des inflorescences. En effet, le PAR absorbé par les feuilles chute de 80% à 50% lors de la floraison (Capitol N200, Allirand et Jullien, comm. pers. INRA Grignon). Dans les feuilles ombrées sénescentes, les mécanismes de protéolyse et de remobilisation de l'azote vers les organes en croissance, dont les inflorescences, se mettent en place. Cependant, la demande en azote des organes puits est certainement inférieure à la quantité d'azote rendu disponible à partir des feuilles sénescentes. Ce déséquilibre des relations sources-puits, dû à la chute brutale du LAI (Leaf Area Index) lors de la floraison couplée à une augmentation lente du PAI (Pod Area Index), conduirait à une réduction de l'absorption d'azote ainsi qu'à la chute de feuilles contenant une teneur en azote résiduel élevée en raison d'un processus de remobilisation de l'azote inachevé.

Une absorption post-floraison est observée (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Hocking *et al.*, 1997 ; Chamorro *et al.*, 2002 ; Barlog et Grzebisz, 2004 ; Malagoli *et al.*, 2005a) ou non (Rossato *et al.*, 2001 ; Malagoli *et al.*, 2004) selon les études, et les régulations à l'origine de ces variations ne sont encore clairement identifiées. La force puits en azote exercée par les siliques en développement pourrait stimuler l'absorption post-floraison lorsque le pool d'azote potentiellement disponible au sein de la plante est insuffisant. Chez le maïs et l'orge, l'absorption post-floraison est respectivement, supérieure et inférieure à l'absorption préfloraison et chez ces deux espèces, l'absorption post-floraison est corrélée au rendement (Montemurro *et al.*, 2006).

C.3 Allocation de l'azote absorbé

Seule la méthodologie reposant sur le marquage ^{15}N permet de suivre l'allocation de l'azote absorbé au sein de la plante. Très peu d'études utilisant un marquage ^{15}N ont été réalisées sur du colza cultivé au champ (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Malagoli *et al.*, 2005a) et aucun travail, à notre connaissance, ne l'a combiné à l'effet de la fertilisation azotée et du génotype. Chez le colza, l'azote absorbé est principalement alloué aux feuilles vertes à la reprise de végétation, aux tiges au cours de la montaison puis aux siliques (Malagoli *et al.*, 2005a ; Rossato *et al.*, 2001). Dans notre étude, des différences d'allocation de l'azote absorbé ont été observées selon le niveau de fertilisation azotée et/ou le génotype (tableaux II.1 et III.1). Ces différences sont liées au profil d'absorption d'azote total (Figures II.3 et III.2). Ainsi, pour les situations culturales (génotypes x traitement N) qui ne présentent qu'une très faible absorption post-floraison (Saturnin N200 et Capitol N100), l'azote absorbé est majoritairement alloué aux feuilles et aux tiges (35-57%) et, de manière minoritaire, aux siliques (4-15%, tableau III.1). A l'inverse, les plantes soumises à

une absence de fertilisation azotée (Capitol N0) principalement allouent l'azote absorbé aux siliques (73%, tableau II.1). La part d'azote absorbé directement allouée aux siliques constitue l'efficacité de translocation de l'azote (NTE, Nitrogen Translocation Efficiency, Figures II.6 et III.7). Dans notre étude, la plus faible NTE a été logiquement observée chez les plantes qui ne présentent qu'une très faible absorption post-floraison, telles que Saturnin N200 (NTE = 20%).

D Efficience de remobilisation de l'azote

D.1 Remplissage en azote des siliques

En raison de la faible absorption post-floraison, la réponse du colza à la fertilisation azotée dépend en partie de la capacité de la culture à remobiliser l'azote des parties végétatives vers les siliques (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Hocking *et al.*, 1997 ; Diepenbrock, 2000 ; Rossato *et al.*, 2001 ; Chamorro *et al.*, 2002 ; Malagoli *et al.*, 2005a,b). Nos résultats montrent que 63-89% de l'azote présent dans les siliques matures est issu de la remobilisation de l'azote des organes végétatifs, indépendamment du traitement azoté et du génotype. Les feuilles et les tiges contribuent de façon majeure au pool global d'azote remobilisé en fournissant, respectivement, 42-59% et 31-41% du pool azoté remobilisé (Tableaux II.1 et III.1), ce qui confirme les résultats d'études antérieures (Rossato *et al.*, 2001 ; Malagoli *et al.*, 2005a). Dans des conditions sub-optimales de fertilisation azotée (N100), la contribution du pivot atteint presque 20% du pool azoté remobilisé (Tableaux II.1 et III.1). La contribution des enveloppes des siliques au remplissage en azote des graines n'a pas été évaluée lors de notre étude mais plusieurs travaux l'estiment à environ 30%, l'efficacité de remobilisation de l'azote des enveloppes vers les graines dépassant 75% (Hocking et Mason, 1993; Schjoerring *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1991; Hocking *et al.*, 1997). Cependant, à notre connaissance, aucun travail ne s'est attaché à l'effet du génotype sur l'efficacité de remobilisation de l'azote des enveloppes alors que plusieurs auteurs suggèrent qu'une proportion de matière sèche structurale plus faible des enveloppes conduirait à une augmentation du rendement (Hocking *et al.*, 1997 ; Dreccer *et al.*, 2000). Toutefois, les conséquences d'une telle remobilisation sur la résistance à l'égrainage doivent être prises en compte.

L'efficacité de remobilisation de l'azote à l'échelle de la plante entière peut être estimée soit (i) par la différence entre la quantité d'azote dans les organes végétatifs au début de la floraison et celle à maturité (efficacité apparente de remobilisation), soit (ii) par la quantité d'azote présent

dans les graines à maturité rapportée au pool global d'azote remobilisé (efficacité réelle de remobilisation, Figures II.6 et III.7). L'efficacité de remobilisation apparente ne tient pas compte de l'absorption post-floraison et peut, dans ce cas, sous-évaluer ou sur-évaluer la remobilisation d'azote des organes végétatifs vers les graines. À l'inverse, l'efficacité de remobilisation réelle est obtenue grâce au marquage ^{15}N tout au long de la période d'étude et évalue précisément la quantité d'azote remobilisée vers les siliques par rapport au pool global d'azote remobilisé. Cependant, nos calculs de l'efficacité réelle de remobilisation ne prennent pas en compte les inflorescences, ce qui aboutit dans le cas de Saturnin N200 à des valeurs légèrement supérieures à 100% (Figure III.7). De par leur développement progressif en siliques, l'étude des flux d'azote des inflorescences est complexe. Une possibilité serait de considérer un seul compartiment « inflorescences + siliques ».

Nos résultats ont mis en évidence une corrélation négative entre l'efficacité de translocation (NTE) et l'efficacité réelle de remobilisation de l'azote (-0,82, $p=0,023$, données non montrées). Effectivement, les plantes dont l'allocation d'azote absorbé vers les siliques est élevée, présentent en contre partie une plus faible efficacité réelle de remobilisation de l'azote (par exemple, Pollen N100, Figure III.7). Une compétition existe donc entre l'allocation directe de l'azote aux graines versus le stockage dans les organes tampons suivi de la remobilisation.

D.2 Asynchronisme entre la remobilisation de l'azote des feuilles et la mise en place des siliques

La remobilisation de l'azote à partir des feuilles vertes a lieu majoritairement avant la floraison, donc avant la mise en place des siliques. L'azote des feuilles remobilisé va être stocké dans les tiges et le pivot, une partie sous forme de protéines de réserve (VSP pour Vegetative Storage Protein, Rossato *et al.*, 2001, 2002a). L'expérimentation au champ de Malagoli *et al.* (2005a) a également mis en évidence un stockage transitoire de l'azote issu des feuilles vers les tiges et les feuilles du haut de la canopée. Dès la mise en place des siliques, l'azote stocké dans les organes végétatifs sera remobilisé et de nouveau stocké dans les enveloppes puis enfin, transféré aux graines. Quels sont les avantages pour la plante de stocker l'azote plutôt que de conserver ses feuilles actives plus longtemps ? Par exemple, le taux d'assimilation nette de dioxyde de carbone par unité de surface est environ 3 fois plus élevé dans les feuilles que dans les siliques, en raison d'une densité de stomates 35 à 50% plus élevée (Gammelvind *et al.*, 1996). Dans un premier temps, la plante aurait donc tout intérêt à conserver ses feuilles. À partir du milieu de la floraison, les siliques reçoivent des intensités lumineuses beaucoup plus élevées que les feuilles (désormais ombrées) ; le LAI chute au profit du PAI, la fixation de dioxyde de carbone par les siliques dépasse alors celle assurée par les feuilles (Gammelvind *et al.*, 1996).

L'ombrage des feuilles lors du développement des inflorescences induit une sénescence des feuilles situées en bas du couvert. Dans les feuilles sénescentes, les processus de dégradation et de remobilisation des nutriments, dont l'azote, se mettent en place. Cependant, les puits d'azote sont à ce moment relativement faibles car le développement des siliques n'a pas débuté. Les feuilles vont donc chuter avant que la remobilisation de l'azote soit achevée, donc avec une teneur en azote résiduel élevée (jusqu'à 3,5% de la Matière Sèche (MS), Malagoli *et al.*, 2005a,b). Dans notre étude, les teneurs d'azote résiduel des feuilles chutées varient de 0,4% à 3,1% de la MS suivant le niveau de fertilisation azotée, le génotype et leur position nodale. Quel que soit le génotype, l'effet de la fertilisation azotée sur la teneur en azote résiduel est significative (Figures II.4 et III.5). Dans le modèle de répartition de l'azote chez le colza de Malagoli *et al.* (2005b), la simulation d'une teneur en azote résiduel des feuilles basales égale à 1% conduit à une réduction des pertes vers l'environnement de 13 kg N ha⁻¹ et à une accumulation supérieure d'azote dans les graines. Ces sorties du modèle montrent que l'augmentation de la capacité des compartiments tampons (tiges, fleurs, rangs foliaires 22-36) à stocker puis à remobiliser des quantités supérieures d'azote issu des feuilles basales vers les siliques améliore à la fois l'efficacité de l'azote et le bilan environnemental du colza.

Un gradient acropète décroissant de la teneur en azote résiduel a été observé par Malagoli *et al.* (2005a) suggérant une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles du haut du couvert par rapport à celles du bas. En effet, la concomitance de la sénescence foliaire avec le remplissage en azote des graines favorise la remobilisation de l'azote. Nous avons observé une tendance similaire, à l'exception du génotype Saturnin N200, pour lequel la teneur en azote résiduel des feuilles situées en haut de la canopée est supérieure à celles du bas. Pourtant, ce génotype présente une efficacité de remobilisation réelle élevée due à une absorption post-floraison extrêmement faible. La forte teneur en azote résiduel des feuilles du haut de la canopée pourrait s'expliquer par une force puits en azote plus faible, en raison de l'importante quantité d'azote déjà remobilisé à partir des organes végétatifs. Par ailleurs, l'acquisition de l'autotrophie des siliques plus rapide chez ce génotype pourrait également expliquer en partie la chute des feuilles avant que les processus liés à la sénescence ne soient achevés (Jullien *et al.*, comm. pers. INRA Grignon).

La teneur en azote résiduel des feuilles chutées renseigne sur l'efficacité de remobilisation. Cependant, les quantités d'azote restituées au sol par chute foliaire dépendent également de la biomasse des feuilles chutées. Dans notre étude, la biomasse cumulée de feuilles chutées est plus faible chez le génotype Pollen quel que soit le traitement azoté (Figures II.4 et III.5). Cependant, pour N200, la teneur en azote résiduel plus élevée chez le génotype Pollen que chez Capitoll

contrebalance la biomasse cumulée plus faible observée chez Pollen ; ainsi, les deux géotypes présentent finalement des pertes d'azote par voie foliaire similaires. Les quantités d'azote perdues par voie foliaire augmentent avec le niveau de fertilisation azotée et atteignent 40-52 kg N ha⁻¹ pour les traitements N200. Ces quantités non négligeables doivent être réduites et nécessitent pour cela une remobilisation de l'azote plus efficace.

D.3 Sénescence foliaire et remobilisation

Probablement en raison d'une force puits en N insuffisante, la majorité des feuilles du bas de la canopée chutent alors que les processus de dégradation et de remobilisation liés à la sénescence ne sont pas achevés. Selon Habekotté (1997), l'augmentation simultanée des capacités sources et puits de la plante pourrait améliorer efficacement le rendement. A partir du modèle de répartition de l'azote, Malagoli *et al.* (2005b) ont montré qu'une durée plus longue de remobilisation des feuilles du bas du couvert avait pour conséquence un transfert direct de l'azote remobilisé à partir de ces feuilles vers les siliques, limitant le stockage temporaire dans les compartiments tampons (tiges, pivot). Ainsi, une meilleure synchronisation de la remobilisation de l'azote et du remplissage en azote des graines pourrait effectivement améliorer l'efficacité de l'azote chez le colza. Dans ce cas, le rendement et l'impact environnemental seraient améliorés.

Une augmentation de la durée du LAI (LAID pour Leaf Area Index Duration) signifie que les feuilles restent actives plus longtemps. Une telle situation serait atteinte si, par exemple, le rythme d'émission de nouvelles feuilles est plus lent (feuilles moins nombreuses) ou si la chute foliaire est retardée. Cependant, très peu de variabilité d'ordre environnemental aussi bien que génotypique dans la dynamique de mise en place des surfaces interceptrices a été observée lors de l'expérimentation champ (Allirand et Jullien, comm. pers. INRA Grignon). Par contre, malgré un LAI maximal similaire quel que soit le géotype (pour un même traitement azoté), le géotype Pollen N200 se caractérise par un nombre de feuilles plus faible et une chute moins brutale du LAI, les feuilles étant maintenues plus longtemps sur la plante (Allirand et Jullien, comm. pers. INRA Grignon). Une compréhension approfondie de la régulation de la sénescence foliaire par la lumière ou par la disponibilité en photoassimilats permettrait de simuler les conditions culturales (densité de semis) ou le morphotype (architecture) les plus favorables au maintien de l'activité des feuilles.

Chez le colza, l'étude de la sénescence foliaire au cours du cycle de développement complet est complexe, en raison du nombre de feuilles (environ 35) et de la durée de vie variable des feuilles selon leur position sur la plante (Malagoli *et al.*, 2005a). La mise au point d'outils

moléculaires (profil d'expression des gènes *SAG12* et *Cab*) sur un modèle simple (rosette de colza) a permis de suivre la progression spatiale et temporelle de la sénescence foliaire et d'identifier la transition sources-puits sur l'axe de la plante (Figure IV.5). Ces outils moléculaires devraient nous permettre d'identifier à un stade donné du développement, les différents rangs foliaires déjà sénescents et de relier cet état de sénescence des feuilles avec leur environnement lumineux, caractérisé par nos collègues de l'INRA de Grignon. A court terme, il s'agirait de vérifier si les différences de comportement observées entre les rangs foliaires situés en haut et en bas de la canopée au cours du remplissage des graines, reposent ou non sur des chronologies de sénescence différentes. Par ailleurs, l'étude des trois géotypes contrastés (architecture et précocité de floraison) devrait mettre en évidence des cinétiques de sénescence foliaire différente en raison de l'environnement lumineux différent. L'effet de la fertilisation azotée à travers les compétitions intra-spécifiques et le rayonnement pourrait également être étudié. A terme, l'objectif serait de pouvoir rechercher parmi un grand nombre de géotypes (à un ou quelques stades précise du développement) ceux dont la cinétique de sénescence permet une remobilisation optimale de l'azote foliaire.

L'analyse et l'exploitation des résultats concernant l'effet de la fertilisation azotée sur la sénescence foliaire ont été réalisées et l'effet du géotype est en cours de réalisation. Cependant, en raison des contraintes liées à l'élaboration de ce manuscrit, les résultats n'ont pu être inclus et feront l'objet d'une future publication.

E Pistes pour l'amélioration variétale

Selon Sattelmacher (1994), une meilleure compréhension de l'efficacité de l'azote serait utile à deux étapes de la sélection. D'une part, cela permettrait d'identifier les traits morphologiques et physiologiques qui limitent soit l'absorption, soit l'utilisation de l'azote et donc de choisir des parents différant sur ces traits. Ainsi, en retenant deux géotypes présentant une bonne efficacité de l'azote, l'un grâce à une absorption efficace (NUpE) et l'autre grâce à une utilisation optimale de l'azote (NUtE), leur croisement pourrait aboutir à des recombinaisons présentant les deux caractéristiques recherchées (NUpE et NUtE élevées). D'autre part, si les traits les plus intéressants peuvent être corrélés avec des caractères facilement mesurables (hauteur de la plante, taille des graines...), une telle approche serait également utile pour identifier les quelques géotypes supérieurs parmi plusieurs milliers.

Une meilleure synchronisation de la remobilisation de l'azote foliaire avec le développement des siliques semble être la piste la plus intéressante. En effet, elle permettrait à la fois d'obtenir une remobilisation foliaire plus efficace et de réduire les pertes d'azote par voie foliaire, donc d'améliorer le bilan environnemental du colza. Le maintien plus tardif des feuilles en bas de la canopée est nécessaire, la problématique est donc d'augmenter la durée du LAI. Si les feuilles chutent en raison de l'extinction du PAR, la réflexion doit porter sur le moyen de réduire l'ombrage au cours de la floraison mais également sur la régulation de la sénescence par la lumière. La diminution de l'ombrage lors de la floraison pourrait être réalisée, par exemple, par des pétales plus petits mais également en limitant la compétition intra-spécifique (couvert moins dense). Une meilleure compréhension de l'effet du PAR sur la sénescence foliaire permettrait de sélectionner des génotypes moins sensibles à l'extinction du PAR, retardant ainsi l'entrée en sénescence des feuilles jusqu'au développement des siliques.

Conclusions et perspectives

Chapitre VI. Conclusions générales et perspectives de recherche

A Conclusions générales

Ce travail de thèse sur les dynamiques d'absorption, de répartition et de remobilisation de l'azote chez le colza d'hiver a souligné la complexité des événements physiologiques et développementaux qui conduisent à une économie de l'azote par la plante, ainsi que la nécessité d'avoir une vue intégrée des processus ayant lieu à des échelles différentes.

A.1 Absorption et répartition de l'azote

- L'accumulation totale d'azote à maturité révèle une importante réponse à la fertilisation azotée mais aucune variabilité génotypique. Une **réduction de l'absorption lors de la floraison** a été observée quel que soit le génotype et le traitement azoté, qui pourrait être due au **déséquilibre entre les sources et les puits d'azote** dans la plante à cet instant précis. Par ailleurs, une **absorption post-floraison** de l'azote a été soulignée à l'exception de deux situations culturales (Capitol N100 et Saturnin N200) ; cependant les régulations et les conditions qui la favorisent restent à identifier.
- La répartition de l'azote absorbé dépend à la fois du niveau de fertilisation azotée et du type variétal. Ainsi, les plantes Capitol N0 allouent en priorité l'azote absorbé aux siliques (70%) alors que les mêmes plantes cultivées sous des conditions supra optimales de fertilisation azotée (N200) allouent la même part d'azote absorbé aux tiges et aux siliques (environ 35%). **La part d'azote absorbé alloué aux tiges et au pivot ne semble pas présenter pas de variabilité génotypique, contrairement à la part d'azote absorbé alloué aux feuilles et aux siliques qui elle, dépend principalement du profil d'absorption post-floraison.**

A.2 Remobilisation de l'azote

- **L'azote contenu dans les siliques à maturité provient majoritairement (63 à 89%) de l'azote remobilisé à partir des organes végétatifs**, la contribution de la remobilisation de

l'azote au remplissage en azote des siliques étant d'autant plus élevée que l'absorption post-floraison est faible.

- **Les feuilles et les tiges constituent les sources majeures d'azote remobilisé** (42-59% et 31-40%, respectivement) quels que soient le génotype et le traitement azoté.
- **La contribution du pivot au pool d'azote remobilisé augmente chez les plantes cultivées sous des conditions sub-optimales de fertilisation azotée** (jusqu'à 20%). L'**asynchronisme entre l'azote remobilisé à partir des feuilles et le développement des siliques**, observé dans l'ensemble des situations culturales, soulignent l'intérêt d'**augmenter la capacité de stockage des organes tampons** tels que le pivot (mais également les tiges), ou de **maintenir les feuilles actives jusqu'au début du développement des siliques**.

A.3 Feuilles chutées

- **L'essentiel du recyclage de la biomasse foliaire ne participe pas directement à la mise en place des organes reproducteurs**. En effet, environ les deux tiers de la biomasse sèche cumulée des feuilles chutées sont atteints avant le début du remplissage des siliques, indépendamment du génotype et du traitement azoté.
- La teneur en azote résiduel des feuilles chutées augmente significativement avec la fertilisation azotée (de 0,7 à 1,4% de la matière sèche pour les plantes Capitot N0 et N200) et varie selon les génotypes et le traitement azoté (Capitot étant le génotype présentant une teneur plus faible en N200 et Saturnin une plus élevée en N100 que les autres génotypes). La teneur en azote résiduel suit globalement un **gradient acropète décroissant**, signifiant qu'une **meilleure remobilisation de l'azote s'opère dans les feuilles apicales**, à l'exception du génotype Saturnin qui présente un gradient inverse.
- A l'échelle de la parcelle, les **quantités d'azote perdues par voie foliaire sont de l'ordre de 15 à 52 kg N ha⁻¹**, selon le niveau de fertilisation et le génotype.

A.4 Indicateurs agronomiques de l'efficacité de la fertilisation azotée

- L'effet de la fertilisation azotée se traduit par un NHI (Nitrogen Harvest Index) et un NUtE (N Utilization Efficiency) plus faibles pour les plantes N200, comparativement aux plantes N100 et N0. A l'inverse du NRE (N Remobilization Efficiency) apparent, le **NRE réel** (obtenu *via* le marquage ¹⁵N) **augmente avec la fertilisation azotée**, indiquant une **meilleure efficacité de remobilisation de l'azote en condition supra-optimale de fertilisation azotée**.

- **La variabilité génotypique est principalement observée avec les indices qui rendent compte des dynamiques de l'azote tout au long de la période étudiée comme le NRE réel et apparent, et le NTE (N Translocation Efficiency).**

A.5 Sénescence foliaire

- **La teneur en chlorophylles** des feuilles individuelles n'est pas différente chez les plantes soumises ou non à une privation en azote, elle ne peut donc constituer un indicateur métabolique convenable de la sénescence foliaire. Alors que les **quantités en protéines solubles et en azote total** rendent compte de la privation en azote, ces quantités sont faibles à la fois dans les feuilles basales et apicales et ne permettent donc pas de différencier les feuilles sénescentes de nouvelles feuilles en croissance.
- Le profil d'expression des gènes *SAG12* (Senescence Associated Gene, codant une protéase à cystéine) et *Cab* (SDG, Senescence Down-regulated Gene, codant une Chlorophyll a/b binding protein) renseigne sur l'état de sénescence de la feuille de manière instantanée, contrairement aux indicateurs métaboliques qui nécessitent une analyse cinétique. Le changement du niveau de transcrits de ces deux gènes souligne que la **transition source-puits** est réalisée et ce changement est plus précoce en cas de privation d'azote ; il rend donc parfaitement compte de l'accélération de la sénescence foliaire en condition de carence azotée. **Le profil d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* semble constituer l'indicateur le plus précis de la progression spatio-temporelle de la sénescence foliaire chez le colza, aussi bien lors d'une sénescence liée au développement qu'induite par une privation en azote.** Cet indicateur discriminant sera utile pour relier la valeur du NUE au cycle de développement des feuilles.

B Perspectives de recherche

- Dans ce travail, nous avons développé des **outils moléculaires (*SAG12/Cab*)** qui se révèlent être des **indicateurs du statut source/puits pour l'azote de la feuille** plus performants que ceux décrits antérieurement (teneur en azote, en chlorophylles, en protéines...). Ces indicateurs permettent de caractériser un rang foliaire selon sa position nodale à tout stade du développement de la plante. A l'avenir, ils permettront (i) de relier les cinétiques de

sénescence foliaire à l'environnement lumineux de la feuille (par exemple, le PAR cumulé depuis l'émission de la feuille) ou à sa position trophique (par exemple, les feuilles du bas ou du haut du couvert), (ii) de rechercher parmi les différentes situations culturales envisagées (génotype x fertilisation azotée) une variabilité génétiquement déterminée ou d'ordre environnemental qui pourrait expliquer les différences de remobilisation de l'azote des feuilles. Ces résultats constitueront la base d'une réflexion quant à l'utilisation potentielle de ces outils moléculaires pour l'amélioration variétale.

- De manière schématique, environ 30% seulement de la biomasse sèche foliaire élaborée au cours du développement contribuera finalement au remplissage des graines. Ce simple constat signifie que l'essentiel de la biomasse foliaire est exploitée pour la croissance d'organes végétatifs (tiges, nouvelles feuilles) qui constituent un appel trophique relativement faible. Des plantes disposant d'une **capacité de remobilisation de l'azote davantage synchronisée avec le développement des organes reproducteurs** possèderaient par conséquent un avantage agronomique supérieur. Mieux synchroniser la remobilisation de l'azote foliaire et le développement des siliques revient à maintenir les feuilles actives plus longtemps, c'est-à-dire à retarder leur entrée en sénescence et/ou à prolonger leur durée de sénescence (donc de remobilisation). Pour parvenir à de tels objectifs, il est indispensable de mieux comprendre les effecteurs de régulation de la sénescence foliaire, qu'il s'agisse d'une régulation (i) par la quantité (PAR cumulé) et/ou la qualité (Ombrage) de la lumière, (ii) le métabolisme carboné ('signal sucre'), ou (iii) les assimilats issus de la protéolyse associée à la sénescence (acides aminés...). Parallèlement, il serait alors pertinent de prendre en compte l'effet de la compétition intra-spécifique liée à la densité de semis, de manière à améliorer les techniques culturales actuelles. A titre d'exemple, des génotypes présentant une sensibilité plus faible à la diminution de l'éclairement, pourraient disposer d'une proportion de feuilles sénescentes inférieure à celle de génotypes plus sensibles. Ainsi, de tels génotypes devraient être moins sensibles à l'extinction du rayonnement provoquée par l'émission de nouveaux organes et donc, les feuilles en bas du couvert conserveraient peut-être une activité photosynthétique plus longtemps.
- **Les tissus de réserve** (pivot, tiges, enveloppes des siliques) **ont un rôle de stockage transitoire de l'azote** particulièrement important en raison de l'asynchronisme entre l'azote remobilisé à partir des feuilles et le développement des siliques. En particulier, le rôle tampon du pivot *via* l'accumulation de la VSP de 23 k Da, semble être d'autant plus

conséquent que la disponibilité en azote est faible. En effet, la contribution du pivot au pool d'azote remobilisé s'élève jusqu'à 20% en conditions sub-optimales de fertilisation azotée. Le pivot constitue donc une réserve d'azote non négligeable. L'augmentation de cette capacité d'accumulation et de remobilisation de l'azote par le pivot mais également par les autres organes tampons, pourrait améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote chez le colza.

- Le jeu de données acquis au cours de ce travail (concentration en nitrate du sol, biomasse racinaire, PAR, température) servira à **alimenter le modèle d'absorption de l'azote** élaboré par Malagoli *et al.* (2004). Les sorties seront confrontées aux résultats acquis et permettront donc de mettre en évidence d'éventuelles variations au modèle initial selon les situations culturales (géotype x fertilisation azotée). Dans la mesure où une distorsion apparaîtrait, les paramètres du modèle devraient être ajustés à chaque géotype (sensibilité des transporteurs, sensibilité à la température...), de manière à comprendre et intégrer la variabilité environnementale et génétique de l'absorption de l'azote. Par la suite, des analyses de sensibilité seront utilisées pour déterminer les paramètres susceptibles d'expliquer la variabilité génotypique observée et des expérimentations en conditions contrôlées testeront les hypothèses retenues. En complément, un module d'allocation de l'azote a été élaboré de manière indépendante ; il décrit la distribution et le recyclage interne de l'azote pour le remplissage des tissus reproducteurs. Un modèle regroupant les modules d'absorption et d'allocation de l'azote devrait permettre, à terme, de hiérarchiser l'importance des différents facteurs modulant ces deux fonctions physiologiques afin de définir les conditions culturales conduisant à une efficacité de l'azote optimale.
- Les différents indices agronomiques mesurés dans ce travail ont montré que les indices généralement utilisés (NHI, NUtE) ne sont pas les mieux adaptés pour mettre en évidence la variabilité génotypique de l'efficacité de l'azote chez le colza. Cependant, l'efficacité réelle de remobilisation de l'azote et l'efficacité de translocation de l'azote ne sont pas facilement accessibles sur le plan méthodologique puisqu'elles exigent l'utilisation d'un marquage ^{15}N tout au long de la période étudiée. Il est donc nécessaire de trouver des **corrélations élevées entre ces indicateurs pertinents et des critères plus facilement mesurables**. Par ailleurs, il apparaît indispensable qu'un effort soit réalisé pour uniformiser la définition des indicateurs au sein de la communauté scientifique.

- L'amélioration du colza sur la base d'une meilleure efficacité de l'azote (NUE) est en retard comparativement à d'autres grandes cultures comme le blé. Il s'avère donc indispensable de développer des approches de **génétique quantitative** afin de déterminer les régions génomiques impliquées dans la remobilisation de l'azote au cours du remplissage des graines. Enfin, et de manière plus générale, l'approche développée dans ce travail, qui vise à terme à améliorer l'efficacité de l'azote, pourra servir de base générique de travail à l'étude de **l'efficacité d'autres éléments** (par exemple, le soufre), **indépendamment de l'espèce étudiée**.

Nouveau Chapitre de la Thèse

Chapitre VII. Valorisation des Compétences: un Nouveau Chapitre de la Thèse

Prénom, Nom du doctorant : Julie Gombert

Ecole doctorale : Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie

Université ou organisme de rattachement : Université de Caen et INRA

Nom du « mentor » : Laurence Varin

Sujet de thèse : Efficience de l'azote par le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) : effet de la fertilisation azotée et variabilité génotypique.

Nom des co-directeurs de thèse : Frédéric Le Dily et Alain Ourry

Date probable de soutenance : Décembre 2006

Cadre général, enjeux et présentation de la thèse

Avec plus d'un million d'hectares, la culture de colza représente actuellement la quatrième espèce la plus cultivée en France et fait de la France, le premier producteur européen de colza avec plus de 4 millions de tonnes de graines récoltées en 2005.

L'intérêt porté au colza durant les dernières décennies s'explique essentiellement en raison de ses débouchés nombreux et variés : l'huile alimentaire, l'alimentation pour le bétail (tourteaux), les biocarburants mais aussi les cosmétiques, détergents, plastiques.... Par ailleurs, le colza présente des avantages liés aux caractéristiques propres à la plante. Par exemple, son enracinement profond permet de restructurer les sols. De plus, sa capacité d'absorption du nitrate particulièrement élevée en fait une espèce « piège à nitrate », contribuant ainsi à la qualité de l'eau des nappes phréatiques.

Cependant, la quantité d'azote retrouvée dans les graines de colza est faible par rapport à celle absorbée par la plante au cours de son développement. Les conséquences principales sont d'ordre économique, liées à un surcoût de fertilisation azotée, et d'ordre environnemental puisque l'azote non mobilisé vers les organes reproducteurs retourne au sol lors de la chute des feuilles. Ces retours d'azote vers l'environnement sont conséquents et font que la culture du colza présente un bilan azoté négatif pour l'environnement.

Un des objectifs principaux de ma thèse visait à caractériser des variétés de colza afin de déterminer s'il existe une variabilité génétique (potentiellement exploitable en sélection) pour deux caractéristiques: une forte capacité d'absorption et une efficacité de transfert élevée de l'azote vers les graines. Pour cela, des variétés de colza contrastées (en terme de phénotype architectural et de précocité), cultivées sous différents régimes de fertilisation azotée, ont été étudiées afin de rechercher d'éventuelles différences de capacité d'absorption et de mobilisation de l'azote.

Mon intérêt pour la recherche se manifeste concrètement lors de mon stage de maîtrise réalisé à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Versailles et se confirme lors du DEA Adaptation des Plantes à l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon (INA-PG) au cours duquel j'ai réalisé le stage de recherche au sein de l'équipe azote de l'unité Mixte de Recherche INRA - Université de Caen Basse Normandie d'Ecophysiologie Végétale et Agronomie (UMR INRA-UCBN 950 EVA).

Au cours de ce stage, le directeur du laboratoire m'a présenté un futur programme de recherche, appelé Promosol Colza Azote. Ce programme serait financé par l'association pour la promotion de la sélection des plantes oléagineuses, Promosol, et consisterait à étudier la dynamique des flux d'azote au sein de la plante en vue de l'amélioration variétale du colza. Dans le cadre de ce programme de recherche, le cofinancement d'une bourse de thèse a été soumis au Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM) et à la région Bas-Normande.

Le sujet de la thèse s'intitulait « Influence du génotype et de la fertilisation azotée sur la gestion de l'azote par le colza d'hiver ». Le thème étudié (l'azote chez les plantes) ainsi que l'approche pluridisciplinaire du sujet (isotopie, physiologie, biologie moléculaire), son côté appliqué (espèce de grande culture, aide à la sélection variétale ...), la collaboration étroite avec l'équipe plante de l'UMR INRA-INAPG EGC (Environnement et Grandes Cultures) de Grignon ainsi que l'encadrement au sein du laboratoire EVA de Caen m'ont totalement convaincue de poursuivre en thèse.

Déroulement, gestion et coût du projet

Mon projet de thèse s'est décomposé en trois grandes étapes : la conception du projet, la réalisation technique et enfin, l'exploitation et la valorisation des résultats.

Conception du projet

La conception du projet a été démarrée à partir de 2002. Un projet commun de recherche sur le colza a été soumis par les laboratoires de Caen et de Grignon auprès de Promosol, qui a validé le programme de recherche. Le but était de comparer trois variétés de colza soumises à des fertilisations azotées croissantes de manière à mettre en évidence des modalités de gestion de l'azote différentes pour chacune des variétés.

Au cours du premier comité de pilotage et lors du Carrefour Colza 2004¹, j'ai présenté les objectifs propres à mon projet et les stratégies expérimentales envisagées. Ces deux rencontres m'ont permis de recadrer mes objectifs et de les valider.

Réalisation technique

L'expérimentation principale a eu lieu durant ma première année de thèse en 2004 et a nécessité une organisation particulière. En effet, le champ expérimental était localisé en région parisienne et la période d'étude s'étalait de Mars à Juillet. En élaborant mon protocole expérimental, j'ai été conduite à organiser l'activité d'un chercheur et de trois techniciens, ce qui m'a amené à définir un budget pour les moyens techniques et humains, validé par le directeur du laboratoire.

J'ai recruté et managé une équipe induisant une organisation complexe des déplacements. Durant cette période, j'étais deux à trois jours par semaine sur le site expérimental de Grignon et le reste à Caen afin de coordonner le suivi des échantillons récoltés et la préparation des prochaines récoltes.

L'analyse de plus de 2 000 échantillons a nécessité environ 7 mois de travail mais nous avons pu au fur et à mesure communiquer les résultats sur les analyses effectuées.

Analyse et Valorisation des résultats

J'ai présenté les premiers résultats lors d'un groupe de travail réunissant mes deux co-directeurs de thèse et trois chercheurs du laboratoire et aboutissant à une validation et à une

¹ Présentation publique annuelle de l'avancement des travaux du programme Promosol à l'adresse des financeurs privés et des grands organismes semenciers de la profession.

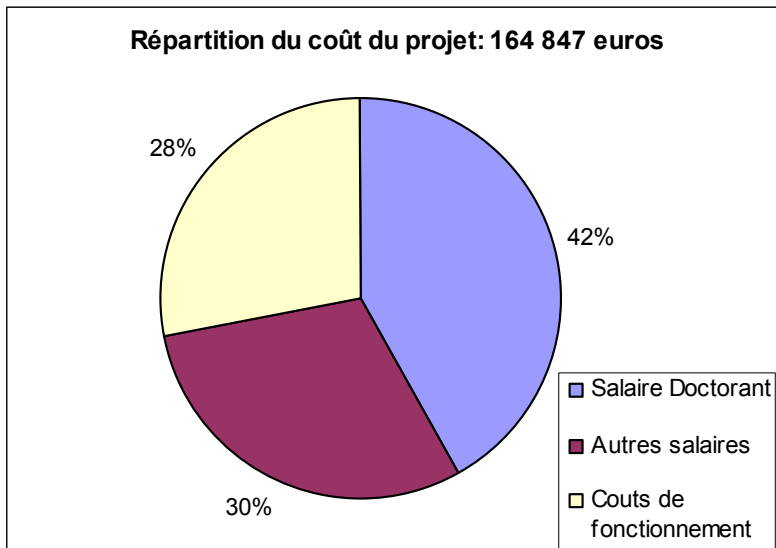


Figure VII.1: Répartition globale du coût de la thèse

RESSOURCES HUMAINES				
Catégorie	nombre	Heures effectuées	Rémunérations et Charges	% du coût total
doctorant	1	5460	68796	41,73
co-directeur de thèse	2	600	26268	15,93
maître de conférences	2	300	10725	6,51
technicien	3	200	3286	1,99
ajt	2	220	3548,6	2,15
contractuel	1	350	5159	3,13
secrétaire	1	35	564,55	0,34
Total	12	7165	118347,15	71,79
et 6 stagiaires non rémunérés (entre 1 et 3 mois)				
COÛTS DE FONCTIONNEMENT			Montant	% du coût total
	Achats consommables		10000	6,07
	Prestations internes		20000	12,13
	Prestations externes		1500	0,91
	Déplacements, missions		10000	6,07
	Formations		5000	3,03
	Total		46500	28,21
Coût total du projet :			164847,15	

Figure VII.2: Répartition détaillée du coût de la thèse

réorientation du projet. Chaque année, en Septembre, j'ai présenté mes résultats et défini un planning pour l'année.

De plus, dans le cadre de l'école doctorale, j'ai réalisé une soutenance de thèse à mi-parcours comprenant un rapport synthétique de l'état d'avancement ainsi qu'une présentation orale devant un jury de spécialistes et non spécialistes.

De même, j'ai communiqué à la région Bas-normande, un rapport d'avancement de mes travaux accompagné d'un avis du directeur de thèse en vue du renouvellement du financement annuel de mon contrat de recherche.

Chaque année, j'ai co-présenté avec nos collègues de Grignon, l'état d'avancement de mes résultats lors du Carrefour Colza devant l'ensemble de la filière semence et lors du comité de pilotage du projet Promosol Colza Azote.

La qualité de collaboration avec le laboratoire INRA Grignon a permis de résoudre des problèmes autour de la transférabilité des résultats de l'échelle de la plante à celle du peuplement. J'ai ainsi participé à la mise au point d'un indice permettant de d'extrapoler les résultats acquis au niveau de la plante isolée à la dimension de la parcelle de culture.

J'ai co-rédigé la rédaction de trois publications scientifiques en langue anglaise et présenté les résultats lors de congrès nationaux ou internationaux à partir de 2005.

Evaluation et prise en charge du coût du projet

Une estimation du coût total du projet, qui s'élève à environ 164 847 euros, ainsi que sa répartition sont représentées dans les figures ci-contre (Figures VII.1 et VII.2).

Les ressources humaines constituent le poste de dépenses le plus significatif du projet, soit 72% dont 42% pour mon salaire (Figure VII.1). Ce financement des salaires a été pris en charge par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Agriculture et enfin, par la Région Bas-Normande et le CETIOM concernant ma thèse.

Les coûts de fonctionnement s'élèvent à 46 500 euros, ce qui représente 28% du coût total et sont financés en partie par Promosol (25 000 euros) et par le laboratoire Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA).

Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

Mes 3 années de thèse m'ont permis de développer et de renforcer de nombreuses compétences scientifiques, techniques et managériales.

Compétences scientifiques

Cette expérience de recherche en écophysiologie végétale m'a amenée à approfondir mes connaissances sur la physiologie de la plante et ses interactions avec l'environnement mais également à élargir mon domaine de compétences à l'agronomie et à la sélection variétale. Par ailleurs, les présentations auxquelles j'ai pu assisté, aussi bien lors de congrès qu'au sein du laboratoire m'ont permis de tendre vers une vision plus globale de la biologie. La participation à des séminaires de réflexion scientifique (Réflexives®), de biologie intégrative, de statistiques et d'anglais a également contribué à enrichir mon approche de la biologie.

En apprenant le métier de chercheur durant ces quatre années (master recherche + doctorat), j'ai pris conscience de la multiplicité des actions entreprises et donc de l'importance des compétences de coordination et de gestion ainsi que l'importance de la collaboration en équipe pour mener à bien le projet.

Compétences techniques

L'étape de définition du projet a nécessité une étude bibliographique pointue. Les outils modernes de ressource documentaire m'ont permis de mieux m'approprier mon sujet et de développer mes compétences d'analyse et de synthèse.

L'étape d'expérimentation m'a permis d'acquérir un savoir-faire technique: utilisation d'isotopes stables (^{15}N), spectrométrie de masse isotopique, analyses biochimiques (extraction et dosage de protéines solubles et d'acides aminés totaux, électrophorèse monodimensionnelle), techniques de biologie moléculaire (extraction et dosage d'ARN totaux, RT-PCR semi-quantitative, clonage

d'ADN dans un plasmide et transformation de bactéries, purification d'ADN plasmidique), culture des plantes en conditions contrôlées et de plein champ, outils statistiques...

Compétences managériales

La phase d'expérimentation m'a conduite à développer des compétences de coordination et de planification ainsi que le déplacement de l'équipe afin que toute démarche soit opérationnelle et réaliste. Le management de cette équipe m'a amenée d'une part à transmettre des consignes, de l'information et d'autre part, à créer les conditions favorables au bon climat dans l'équipe.

Durant ma thèse, j'ai également enseigné (tutorat, IUFM) et encadré six stagiaires au total. J'ai ainsi développé des compétences en terme de pédagogie et permis à chaque étudiant stagiaire de se positionner et de s'approprier son sujet de stage.

En terme de compétences de communication et de promotion, j'ai géré l'information, rédigé et communiqué auprès d'un auditoire de spécialistes et de non spécialistes.

Par ailleurs, j'ai été amenée à réaliser différentes rencontres dans les laboratoires partenaires du projet de thèse, ce qui m'a amenée à constituer un réseau professionnel significatif.

En résumé, les principales compétences que j'ai développées au cours de ma thèse sont des capacités de synthèse, d'analyse, d'encadrement, de rédaction et de communication. D'un point de vue plus personnel, j'ai appris à gérer de manière autonome mon projet de recherche et à bien organiser mon temps. Par ailleurs, j'ai acquis des compétences de gestion et de coordination entre les deux laboratoires.

Résultats, impact de la thèse

Les travaux réalisés au cours de ma thèse permettent de mieux comprendre l'influence de la fertilisation azotée et du génotype sur la gestion de l'azote par le colza. Les différences de gestion de l'azote selon les variétés et le défaut de mobilisation de l'azote des feuilles sont des pistes pour l'amélioration variétale. Ainsi, l'impact « appliqué » de mon travail de thèse s'adresse

aux sélectionneurs et/ou améliorateurs de colza (et plus largement des espèces de grandes cultures) et par conséquence à la société. Des colzas plus efficaces dans leur gestion de l'azote permettraient de réduire la fertilisation azotée et donc les risques environnementaux (lessivage des nitrates), tout en conservant un rendement économiquement satisfaisant.

En ce qui concerne le laboratoire d'accueil, mon travail a des retombées diverses. Tout d'abord, la valorisation des résultats en termes de publications et de communications démontre la pertinence d'un tel sujet d'étude ainsi que la qualité du laboratoire. Par ailleurs, la collaboration avec le laboratoire de Grignon a été constructive et aboutira prochainement à la mise en place de nouveaux projets.

Me concernant, cette première expérience professionnelle a été très enrichissante. J'ai découvert les différentes facettes du métier de chercheur et j'ai pris conscience que les compétences développées sont transférables à d'autres secteurs d'activité. Ainsi, outre le métier de chercheur en écophysiologie ou biologie végétale dans des organismes de recherche (CETIOM, INRA, IRD, CNRS) auquel j'aspire, je suis également intéressée par des fonctions d'ingénieur de recherche et de responsable projet dans le domaine de l'amélioration variétale (industrie semencière comme Clause Tézier, Pioneer, Biogemma...).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Allen EJ, Morgan DJ. 1972.** A quantitative analysis of the effects of nitrogen on the growth, development and yield of oilseed rape. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* **78**: 315-324
- Balibrea Lara ME, Gonzalez Garcia M-C, Fatima T, Ehness R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T. 2004.** Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell* **16**: 1276-1287
- Barlog P, Grzebisz W. 2004.** Effect of timing and nitrogen fertilizer application on winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). II. nitrogen uptake dynamics and fertilizer efficiency. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**: 314-323
- Ben Zioni A, Vaadia Y, Lips SH. 1971.** Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiologia Plantarum* **24**: 288-290
- Beuve N, Rispail N, Laine P, Cliquet J-B, Ourry A, Le Deunff E. 2004.** Putative role of γ -aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1035-1046
- Bilborrow PE, Evans EJ, Zhao FJ. 1993.** The influence of spring nitrogen on yield, yield components and glucosinolate content of autumn-sown oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Science, Cambridge* **120**: 219-224
- Bouchart V, Macduff JH, Ourry A, Svenning MM, Gay AP, Simon JC, Boucaud J. 1998.** Seasonal pattern of accumulation and effects of low temperatures on storage compounds in *Trifolium repens*. *Physiologia Plantarum* **104**: 65-74
- Bradford M. 1976.** A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Britto D, Kronzucker H. 2003.** Ion fluxes and cytosolic pool sizes: examining fundamental relationships in transmembrane flux regulation. *Planta* **217**: 490-497
- Brouquisse R, Fischer A, Raymond P. 1997.** La protéolyse chez les plantes supérieures: nature, fonction et régulation. In: *Assimilation de l'azote chez les plantes*. Ed Morot-Gaudry J-F, INRA, Paris. 327-350.

- Brouquisse R, Masclaux C, Feller U, Raymond P. 2001.** Protein hydrolysis and nitrogen remobilization in plant life and senescence. In: *Plant nitrogen*. Ed Morot-Gaudry J-F, Springer-Verlag, Berlin. pp275-293.
- Buchanan-Wollaston V. 1994.** Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiology* **105**: 839-846
- Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C. 1997.** Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Molecular Biology* **33**: 821-834
- Buchanan-Wollaston V, Morris K. 2000.** Senescence and cell death in *Brassica napus* and *Arabidopsis*. In: *Programmed Cell Death in Animals and Plants*. Eds Bryant JA, Hughes, SG, Garland, JM, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford. pp163-174
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harisson E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D. 2003.** The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**: 3-22
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin J-F, Wu S-H, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver C, J. 2005.** Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **42**: 567-585
- Chamorro AM, Tamagno LN, Bezus R, Sarandon SJ. 2002.** Nitrogen accumulation, partition, and nitrogen-use efficiency in canola under different nitrogen availabilities. *Communications in Soil Sciences and Plant Analysis* **33**: 493-504
- Chapin FS, Schulze E, Mooney HA. 1990.** The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**: 423-447
- Chapman JF, Dalniels RW, Scaisbrick DH. 1984.** Field studies on ¹⁴C assimilate fixation and movement in oil-seed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural Science, Cambridge* **102**: 23-31
- Chiu C-C, Lin C-S, Hsia A-P, Su R-C, Lin H-L, Tsay Y-F. 2004.** Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant & cell physiology* **45**: 1139-1148
- Coleman GD, Chen THH, Fuchigami LH. 1992.** Complementary DNA cloning of poplar bark storage protein and control of its expression by photoperiod. *Plant Physiology* **98**: 687-693

- Coleman GD, Englert JM, Chen T, Fuchigami LH. 1993.** physiological and environmental requirements for poplar (*Populus deltoides*) bark storage protein degradation. *Plant Physiology* **102**: 53-59
- Cooper HD, Clarkson DT. 1989.** Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals--A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *Journal of Experimental Botany* **40**: 753-762
- Crafts-Brandner S, Salvucci ME, Egli DB. 1990.** Changes in ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and ribulose 5-phosphate kinase abundances and photosynthetic capacity during leaf senescence. *Photosynthesis Research* **23**: 223-230
- Crafts-Brandner S, Klein R, Klein P, Holzer R, Feller U. 1996.** Coordination of protein and mRNA abundances of stromal enzymes and mRNA abundances of the Clp proteases subunits during senescence of *Phaseolus vulgaris* (L.). *Planta* **200**: 312-318
- Crafts-Brandner S, Hölzer R, Feller U. 1998.** Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **102**: 192-200
- Crawford T, Rending V, Broadbent F. 1982.** Sources, fluxes and sinks of nitrogen during early reproductive growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology* **70**: 1654-1660
- Dalling M, Boland G, Wilson J. 1976.** Relation between acid proteinase activity and redistribution of nitrogen during grain development in wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* **3**: 721-730
- Dejoux JF. 1999.** Evaluation d'itinéraires techniques du colza d'hiver en semis très précoces. Analyse agronomique, conséquences environnementales et économiques. Thèse de Doctorat, INA Paris-Grignon, France.
- Dejoux J-F, Recous S, Meynard J-M, Trinsoutrot I, Leterme P. 2000.** The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralisation, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil* **218**: 257-272
- Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L. 1995.** Diurnal regulation of NO₃⁻ uptake in soybean plants I. Changes in NO₃⁻ influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1585-1594
- Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L. 1996.** Diurnal regulation of NO₃⁻ uptake in soybean plants IV. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *Journal of Experimental Botany* **47**: 893-900

- Delogu G, Cattivelli L, Pecchioni N, De Falcis D, Maggiore T, Stanca AC. 1998.** Uptake and agronomic efficiency of nitrogen in winter barley and winter wheat. *European Journal of Agronomy* **9**: 11-20
- Diepenbrock W. 2000.** Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Field Crops Research* **67**: 35-49
- Dreccer MF, Grashoff C, Rabbinge R. 1997.** Source-sink ratio in barley (*Hordeum vulgare* L.) during grain filling: effects on senescence and grain protein concentration. *Field Crops Research* **49**: 269-277
- Dreccer MF, Schapendonk AHCM, Slafer GA, Rabbinge R. 2000.** Comparative response of wheat and oilseed rape to nitrogen supply: absorption and utilisation efficiency of radiation and nitrogen during the reproductive stages determining yield. *Plant and Soil* **220**: 189-205
- Evans EJ. 1984.** Pre-anthesis growth and its influence on seed yield in winter oilseed rape. *Aspects of Applied Biology* **6**: 81-90
- Faure-Rabasse S, Le Deunff E, Laine P, Macduff JH, Ourry A. 2002.** Effects of nitrate pulses on BnNRT1 and BnNRT2 genes: mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1711-1721
- Feller U, Keist M. 1986.** Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In: *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Eds Lambers H, Neeteson, J, Stulen, I, Nijhoff and Martinus Publishers. Dordrecht. pp 219-234.
- Feller U, Fischer A. 1994.** Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Review of Plant Sciences* **13**: 241-273
- Finneman J, Schjoerring J. 2000.** Post-translocational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *The Plant Journal* **24**: 171-184
- Forde BG. 2000.** Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**: 219-235
- Forde BG. 2002.** Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 203-224
- Gabrielle B, Denoroy P, Gosse G, Justes E, Andersen MN. 1998.** A model of leaf area development and senescence for winter oilseed rape. *Field Crops Research* **57**: 209-222

- Gabrielle B, Recous S, Tuck G, Bradbury NJ, Nicolardot B. 2001.** Ability of the SUNDIAL model to simulate the short-term dynamics of ^{15}N applied to winter wheat and oilseed rape. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* **137**: 157-168
- Gammelvind L, Schjoerring J, Mogensen V, Jensen C, Bock J. 1996.** Photosynthesis in leaves and siliques of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* **186**: 227-236
- Gan S, Amasino RM. 1995.** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**: 1986-1988
- Gan S, Amasino RM. 1997.** Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology* **113**: 313-319
- Garbarino J, Osumi T, Belknap W. 1995.** Isolation of a polyubiquitin promoter and its expression in transgenic potato plants. *Plant Physiology* **109**: 1371-1378
- Glass ADM, Siddiqi MY. 1995.** Nitrogen absorption by plant roots. In: *Nitrogen nutrition in higher plants*. Eds Srivastava HS, Singh, RP, Associated publishing Co. New Delhi. pp 21-56.
- Gombert J, Etienne P, Ourry A, Le Dily F. 2006.** The expression patterns of *SAG12/Cab* genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1949-1956
- Goulas E, Le Dily F, Teissedre L, Corbel G, Robin C, Ourry A. 2001.** Vegetative storage proteins in white clover (*Trifolium repens* L.): quantitative and qualitative features. *Annals of Botany* **88**: 789-795
- Grami B, LaCroix LJ. 1977.** Cultivar variation in total nitrogen uptake in rape. *Canadian Journal of Plant Science* **57**: 619-624
- Grandgirard D. 2001.** Analyse et modélisation du déterminisme de la teneur en azote des graines chez le soja (*Glycine max* L. Merrill) : relation entre la remobilisation d'azote vers les graines et l'élaboration du rendement et de sa qualité. Thèse de Doctorat Université de Bourgogne, France.
- Grbic V. 2002.** Spatial expression pattern of *SAG12:GUS* transgene in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiologia Plantarum* **116**: 416-422
- Grbic V. 2003.** SAG2 and SAG12 protein expression in senescing *Arabidopsis* plants. *Physiologia Plantarum* **119**: 263-269
- Grignon C, Thibaud JB, Lamaze T. 1997.** Transport du nitrate par la racine. In: *Assimilation de l'azote par les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. Ed Morot-Gaudry JF, INRA, Paris. pp 27-43.

- Habekotte B. 1993.** Quantitative analysis of pod formation, seed set and seed filling in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) under field conditions. *Field Crops Research* **35**: 21-33
- Habekotte B. 1997.** Options for increasing seed yield of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a simulation study. *Field Crops Research* **54**: 109-126
- Hensel L, Grbic V, Baumgarten D, Bleecker A. 1993.** Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**: 553-564
- Himelblau E, Amasino RM. 2001.** Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1317-1323
- Hinder B, Schellenberg M, Rodoni S, Ginsburg S, Vogt E, Martinoia E, Matile P, Hörtensteiner S. 1996.** How plants dispose of chlorophyll catabolites. Directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products into isolated vacuoles. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 27233-27236
- Hocking PJ, Mason L. 1993.** Accumulation, distribution and redistribution of dry matter and mineral nutrients in fruits of canola (oilseed rape), and the effects of nitrogen fertiliser and windrowing. *Australian Journal of Agriculture Research* **44**: 1377-1388
- Hocking P, Randall P, DeMarco D. 1997.** The response of dryland canola to nitrogen fertilizer: partitioning and mobilization of dry matter and nitrogen, and nitrogen effects on yield components. *Field Crops Research* **54**: 201-220
- Holmes M. 1980.** Nutrition of the oilseed rape crop. Applied Science Publishers, London, England.
- Hortensteiner S, Feller U. 2002.** Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**: 927-937
- Hörtensteiner S, Wuthrich K, Matile P, Ongania K, Krautler B. 1998.** The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. Cleavage of pheophorbide a macrocycle by a monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 15336-15339
- Huang NC, Chiang CS, Crawford NM, Tsay YF. 1996.** CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. *The Plant Cell* **8**: 2183-2191
- Huang N-C, Liu K-H, Lo H-J, Tsay Y-F. 1999.** Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant Cell* **11**: 1381-1392
- Huehn M. 1998.** A general approach to determine the effect of accuracy of sowing technique on yield per area. *Journal of Agronomy and Crop Science* **181**: 249-255

- Imsande J, Touraine B. 1994.** N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* **105**: 3-7
- Jackson GD. 2000.** Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agronomy Journal* **92**: 644-649
- Jensen LS, Christensen L, Mueller T, Nielsen NE. 1997.** Turnover of residual ¹⁵N-labelled fertilizer N in soil following harvest of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* **190**: 193-202
- Jordi W, Schapendonk A, Davelaar E, Stoopen GM, Pot CS, De Visser R, Rhijn JAV, Gan S, Amasino RM. 2000.** Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell and Environment* **23**: 279-289
- Kamh M, Wiesler F, Ulas A, Horst WJ. 2005.** Root growth and N-uptake activity of oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars differing in nitrogen efficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**: 130-137
- Kappen L, Hammler A, Schutz G. 1998.** Seasonal changes in the photosynthetic capacity of winter rape plants under different nitrogen regimes measured in the field. *Journal of Agronomy and Crop Science* **181**: 179-187
- Keiller DR, Morgan DJ. 1988.** Distribution of ¹⁴carbon-labelled assimilates in flowering plants of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of agricultural sciences, Cambridge* **111**: 347-355
- Kirkegaard JA, Hocking PJ, Angus JF, Howe GN, Gardner PA. 1997.** Comparison of canola, Indian mustard and Linola in two contrasting environments. II. Break-crop and nitrogen effects on subsequent wheat crops. *Field Crops Research* **52**: 179-191
- Lainé P, Ourry A, Macduff J, Boucaud J, Salette J. 1993.** Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum* **88**: 85-92
- Lawlor DW. 2002.** Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany* **53**: 773-787
- Lee R, Wang C, Chen S. 2001.** Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1117-1121
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. 1999.** Molecular and functional regulation of two NO₃ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* **18**: 509-519

- Leleu O, Vuylsteker C, Tetu J-F, Degrande D, Champolivier L, Rambour S. 2000.** Effect of two contrasted N fertilisations on rapeseed growth and nitrate metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 639-645
- Leterme P. 1988.** Modélisation du fonctionnement du peuplement de colza d'hiver en fin de cycle : élaboration des composantes finales du rendement. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza*. Eds CETIOM-INRA, Paris. pp 124-129
- Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM. 1994.** Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **92**: 322-328
- Mach J, Castillo A, Hoogstraten R, Greenberg J. 2001.** The *Arabidopsis* accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**: 771-776
- Mae T, Ohira K. 1981.** The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant & cell physiology* **24**: 1079-1086
- Maiurizi M. 1992.** Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* **48**: 178-201
- Malagoli P, Lainé P, Le Deunff E, Rossato L, Ney B, Ourry A. 2004.** Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv capitot during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology* **134**: 388-400
- Malagoli P, Lainé P, Rossato L, Ourry A. 2005a.** Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. I. global n flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* **95**: 853-861
- Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A. 2005b.** Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II. an ¹⁵N-labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany* **95**: 1187-1198
- Masclaux C, Valadier M-H, Brugiére N, Morot-Gaudry J-F, Hirel B. 2000.** Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**: 510-518
- Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H, Krautler B. 1996.** Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiology* **112**: 1403-1409
- Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H. 1999.** Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 67-95

- Mendham NJ, Shipway PA, Scott RK. 1981.** The effects of delayed sowing and weather on growth, development and yield of winter oil-seed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural Science, Cambridge* **96**: 389-416
- Merrien A, Palleau J, Maisonneuve C. 1988.** Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. In: *Physiologie et élaboration du rendement du colza*. Eds CETIOM-INRA, Paris. pp 34-46.
- Millard P. 1988.** The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant, Cell and Environment* **11**: 1-8
- Moll RH, Kamprath EJ, Jackson WA. 1982.** Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal* **74**: 562-564
- Monje O, Bugbee B. 1992.** Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *Hortscience* **27**: 69-71
- Monson RK, Schulze E-D, Freund M, Heilmeier H. 1994.** The influence of nitrogen availability on carbon and nitrogen storage in the biennial *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. II. The cost of nitrogen storage. *Plant, Cell and Environment* **17**: 1133-1141
- Montemurro F, Maiorana M, Ferri D, Convertini G. 2006.** Nitrogen indicators, uptake and utilization efficiency in a maize and barley rotation cropped at different levels and sources of N fertilization. *Field Crops Research* **99**: 114-124
- Nam HG. 1997.** The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 200-207
- Noh Y-S, Amasino RM. 1999.** Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **41**: 195-206
- Noodén LD. 1988.** The phenomena of aging and senescence. In: *Senescence and Aging in Plants*. Eds Noodén L, Leopold, A, Academic Press Inc., London. pp 1-50.
- Noodén LD, Guiamet J, John I. 1997.** Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**: 746-753
- Noquet C, Avice J-C, Rossato L, Beauclair P, Henry M-P, Ourry A. 2004.** Effects of altered source-sink relationship on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Science* **166**: 1007-1018
- Ogunlela V, Kullmann A, Geisler G. 1989.** Leaf growth and chlorophyll content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) as influenced by nitrogen supply. *Journal of Agronomy and Plant Science* **163**: 73-89

- Ono K, Ishimaru K, Aoki N, Ohsugi R. 1999.** Transgenic rice with low sucrose-phosphate synthase activities retain more soluble protein and chlorophyll during flag leaf senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 949-953
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2002.** Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology* **129**: 886-896
- Pechan PA, Morgan DG. 1985.** Defoliation and its effects on pod and seed development in oil seed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* **36**: 458-468
- Peoples M, Dalling M. 1988.** The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: *Senescence and aging in plants*. Eds Noodén L, Leopold, A, Academic Press, London. pp 181-217.
- Pourtau N, Marès M, Purdy S, Quentin N, Ruël A, Wingler A. 2004.** Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta* **219**: 765-772
- Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A. 2006.** Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* **V224**: 556-568
- Rathke G-W, Christen O, Diepenbrock W. 2005.** Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown in different crop rotations. *Field Crops Research* **94**: 103-113
- Rathke G-W, Behrens T, Diepenbrock W. 2006.** Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **117**: 80-108
- Roberts I, Murray PF, Passeron S, Barneix AJ. 2002.** The activity of the 20S proteasome is maintained in detached wheat leaves during senescence in darkness. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 161-166
- Rodoni S, Mühlecker W, Anderl M, Krautler B, Moser D, Thomas H, Matile P, Hörtensteiner S. 1997.** Chlorophyll breakdown in senescent chloroplasts. Cleavage of pheophorbide *a* in two enzymic steps. *Plant Physiology* **115**: 669-676
- Rood SB, Major DJ, Carefoot JM, Bole JB. 1984.** Seasonal distribution of nitrogen in oilseed rape. *Field Crops Research* **8**: 333-340
- Rossato L, Lainé P, Ourry A. 2001.** Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1655-1663

- Rossato L, Le Dantec C, Lainé P, Ourry A. 2002a.** Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle. Identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *Journal of Experimental Botany* **53**: 265-275
- Rossato L, MacDuff JH, Lainé P, Le Deunff E, Ourry A. 2002b.** Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1131-1141
- Rousseaux MC, Hall AJ, Sanchez RA. 2000.** Basal leaf senescence in a sunflower (*Helianthus annuus*) canopy: responses to increased R/FR ratio. *Physiologia Plantarum* **110**: 477-482
- Sattelmacher B, Horst WJ, Becker HC. 1994.** Factors that contribute to genetic variation for nutrient efficiency of crop plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **157**: 215-224
- Schieving F, Poorter H. 1999.** Carbon gain in a multispecies canopy: the role of specific leaf area and photosynthetic nitrogen-use efficiency in the tragedy of the commons. *New Phytologist* **143**: 201-211
- Schiltz S, Gallardo K, Huart M, Negroni L, Sommerer N, Burstin J. 2004.** Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. *Plant Physiology* **135**: 2241-2260
- Schiltz S, Munier-Jolain N, Jeudy C, Burstin J, Salon C. 2005.** Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by ¹⁵N in vivo labeling throughout seed filling. *Plant Physiology* **137**: 1463-1473
- Schjoerring JK, Bock JGH, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO. 1995.** Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* **177**: 255-264
- Siddiqi MY, Glass ADM, Ruth TJ, Rufty TW, Jr. 1990.** Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of ¹³NO₃⁻ influx. *Plant Physiology* **93**: 1426-1432
- Singh VP, Arora A. 2001.** Intraspecific variation in nitrogen uptake and nitrogen utilization efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* **186**: 239-244
- Smart CJ, Monéger F, Leaver C, J. 1994.** Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *The Plant Cell* **6**: 811-825

- Smith CJ, Wright GC, Woodroffe MR. 1988.** The effect of irrigation and nitrogen fertilizer on rapeseed (*Brassica napus*) in south-eastern Australia. II. Nitrogen accumulation and oil yield. *Irrigation Science* **9**: 15-25
- Soltani A, Robertson MJ, Manschadi AM. 2006.** Modeling chickpea growth and development: Nitrogen accumulation and use. *Field Crops Research* **99**: 24-34
- Spiertz JHJ, Vos NMD. 1983.** Agronomical and physiological aspects of the role of nitrogen in yield formation of cereals. *Plant and Soil* **V75**: 379-391
- Staswick PE. 1988.** Soybean vegetative storage protein structure and gene expression. *Plant Physiology* **87**: 250-254
- Staswick PE, Huang J-F, Rhee Y. 1991.** Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. *Plant Physiology* **96**: 130-136
- Stephenson LC, Bunker TW, Dubbs WE, Grimes HD. 1998.** Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. *Plant Physiology* **116**: 923-933
- Stessman D, Miller A, Spalding M, Rodermeil S. 2002.** Regulation of photosynthesis during *Arabidopsis* leaf development in continuous light. *Photosynthesis Research* **72**: 27-37
- Svecnjak Z, Rengel Z. 2006.** Canola cultivars differ in nitrogen utilization efficiency at vegetative stage. *Field Crops Research* **97**: 221-226
- Sylvester-Bradley R, Makepeace RJ. 1984.** A code for stages of development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Aspects of Applied Biology* **6**: 399-419
- Taylor AJ, Smith CJ, Wilson IB. 1991.** Effect of irrigation and nitrogen fertilizer on yield, oil content, nitrogen accumulation and water use of canola (*Brassica napus* L.). *Fertilizer Research* **29**: 249-260
- Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C, Stead AD. 2003.** Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1127-1132
- Tittonel ED, Chaput JP, Letoublon F, Bonnot O. 1988.** Reprise au printemps et mise à fleurs chez le colza d'hiver. In: *Physiologie et élaboration du rendement du colza*. Eds CETIOM-INRA, Paris. pp 68-72.
- Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hörtensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E. 1998.** An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *The Plant Journal* **13**: 773-780
- Tranbarger TJ, Franceschi VR, Hildebrand DF, Grimes HD. 1991.** The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *The Plant Cell* **3**: 973-987

- Triboi-Blondel A-M. 1988.** Mise en place et fonctionnement des feuilles de colza d'hiver: relations azote-carbone et sénescence. *Agronomie* **8**: 37-44
- Tsay Y-F, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM. 1993.** The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**: 705-713
- Uribelarrea M, Moose SP, Below FE. 2007.** Divergent selection for grain protein affects nitrogen use in maize hybrids. *Field Crops Research* **100**: 82-90
- Van Cleve B, Apel K. 1993.** Induction by nitrogen and low temperature of storage-protein synthesis in poplar trees exposed to long days. *Planta* **189**: 157-160
- Vicentini F, Hörtensteiner S, Schellenberg M, Thomas H, Matile P. 1995.** Chlorophyll breakdown in senescent leaves: identification of the biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis* Huds. *New Phytologist* **129**: 247-252
- Walker KC, Booth EJ. 2001.** Agricultural aspects of rape and other *Brassica* products. *European Journal of Lipid Science and Technology* **103**: 441-446
- Wardlaw IF. 1990.** The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* **116**: 341-381
- Weaver ML, Gan S, Quirino B, Amasino RM. 1998.** A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* **37**: 455-469
- Weaver ML, Amasino RM. 2001.** Senescence is induced in individual darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* **127**: 876-886
- Wingler A, van Schäwen A, Leegood R, Lea P, Quick W. 1998.** Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. *Plant Physiology* **116**: 329-335
- Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N. 2006.** The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**: 391-399
- Wittenbach VA. 1983.** Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. *Plant Physiology* **73**: 125-129
- Wright GC, Smith CJ, Woodroffe MR. 1988.** The effect of irrigation and nitrogen fertilizer on rape seed (*Brassica napus*) production in south eastern Australia. I. Growth and seed yield. *Irrigation Science* **9**: 1-13
- Yang JC, Zhang JH, Wang ZQ, Zhu QS, Liu LJ. 2003.** Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant, Cell and Environment* **26**: 1621-1631

- Yau SK, Thurling N. 1987.** Variation in nitrogen response among spring rape (*Brassica napus*) cultivars and its relationship to nitrogen uptake and utilization. *Field Crops Research* **16**: 139-155
- Yoshida T, Minamikawa T. 1996.** Successive amino-terminal proteolysis of the large subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *European journal of biochemistry* **238**: 317-324
- Yoshida S. 2003.** Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 79-84
- Zavaleta-Mancera H, Franklin K, Ougham H, Thomas H, Scott I. 1999.** Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. Reapparance of NADH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1677-1682
- Zhang QZ, Kullmann A, Geisler G. 1991.** Nitrogen transportation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant during flowering and early siliqua developing. *Journal of Agronomy and Crop Science* **167**: 229-235